

**Titre:** Biodégradation du PCP en milieu aqueux  
Title:

**Auteur:** Carol Panneton  
Author:

**Date:** 1994

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Panneton, C. (1994). Biodégradation du PCP en milieu aqueux [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
Citation: <https://publications.polymtl.ca/6729/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/6729/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de  
recherche:**  
Advisors:

**Programme:** Non spécifié  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

BIODÉGRADATION DU PCP  
EN MILIEU AQUEUX

par

Carol PANNETON  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU GRADE DE MAÎTRE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES (M.Sc.A.)  
(GÉNIE CHIMIQUE)

JUIN 1994

© droits réservés de Carol PANNETON 1994.



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-33171-7

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE

Ce mémoire intitulé:

BIODÉGRADATION DU PCP EN MILIEU AQUEUX

présenté par: Carol PANNETON

en vue de l'obtention du grade de: Maître ès Sciences

Appliquées (M.Sc.A.)

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

M. LEGROS Robert, Ph.D., président

M. MAYER Raymond, M.Sc.A., membre et directeur de recherche

M. CHAVARIE Claude, Ph.D., membre et co-directeur de recherche

M. RAMSAY Bruce, Ph.D., membre

À ma mère, mon père  
et Christophe

## SOMMAIRE

Les objectifs de ce travail étaient d'adapter une culture mixte en chemostat pour la dégradation du pentachlorophénol (PCP) puis d'étudier l'influence de la stratégie de préparation d'inoculum pour la dégradation et la minéralisation du PCP en milieux aqueux. Deux stratégies ont été étudiées, soit une inoculation directe à partir du chemostat ou la préparation d'un inoculum avec ajout de glucose. Ces deux préparations d'inoculum ont été comparées à l'aide de procédés en cuvée et en cuvée alimentée sur les bases suivantes: la latence observée avant la dégradation, l'évolution de la biomasse et les taux de dégradation spécifiques et non-spécifiques. La culture en cuvée alimentée a été utilisée pour simuler un procédé en continu, puisque ce dernier peut entraîner un lavage de la biomasse à des taux de dilution élevés.

En cuvée, lorsque les flacons sont inoculés directement du chemostat, la culture mixte développée, appelée consortium A, peut dégrader jusqu'à 800 ppm de PCP. Une étude a montré que le  $^{14}\text{C}$ -PCP était minéralisé avec une conversion en  $^{14}\text{CO}_2$  de 70%. Ce pourcentage est comparable à ceux retrouvés dans la littérature. La latence observée avant la dégradation augmente avec la concentration initiale en PCP mais pas de

façon linéaire: le temps requis pour induire les enzymes responsables de la dégradation semble donc de plus en plus long selon la concentration de PCP traitée. La concentration cellulaire totale augmente en début de dégradation du PCP puis se stabilise. Par contre, les cellules spécifiques à la dégradation croissent durant la dégradation. Cette croissance ne se reflète pas sur la concentration totale en biomasse car les cellules spécifiques sont très peu nombreuses par rapport à celles-ci ( $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  %). Lorsque le PCP est la seule source de carbone, le taux de dégradation augmente entre 50 et 500 ppm avec des valeurs se situant entre 2.5 et 11 ppm PCP/h. Par contre, le taux spécifique de dégradation est d'ordre zéro dans cette même plage avec une valeur moyenne de  $2.5 \times 10^{-11}$  mg PCP/cellule.h.

L'utilisation d'un co-substrat lors de la préparation d'un inoculum se traduit tout d'abord par l'augmentation de la concentration cellulaire totale. En cuvée et en présence de glucose, il semble que la latence diminue en augmentant la concentration cellulaire initiale mais est plus élevée qu'en absence de glucose. Ceci s'explique par un changement de la population microbienne lors d'ajout d'une source de carbone facilement assimilable comme le glucose. Aucune variation de la concentration en biomasse n'a été observée durant l'expérimentation puisqu'il n'y avait que 50 ppm de PCP dans

le milieu de culture, donc très peu de source de carbone pour les cellules présentes. Le taux de dégradation du PCP, dont les valeurs se situent entre 0.17 et 2.5 ppm PCP/h, augmente avec la concentration cellulaire. Par contre, ces cellules dégradent la même quantité de PCP dans le temps, puisque le taux spécifique est d'ordre zéro, avec une valeur de  $4.4 \times 10^{-13}$  mg PCP/cellule.h, lorsqu'initialement il y a entre  $1.4 \times 10^8$  et  $3.5 \times 10^9$  cellules/mL. Ces taux spécifiques et non-spécifiques sont plus faibles que lorsque le milieu de culture est inoculé directement du chemostat.

Pour un traitement en cuvée alimentée, peu importe la stratégie de préparation de l'inoculum, une latence est observée seulement lors de la dégradation du premier 50 ppm de PCP. Les enzymes sont induites lors de cette dégradation et lorsque du PCP est par la suite ajouté au milieu, il est dégradé tout de suite. Pour la première stratégie d'inoculation (le PCP est la seule source de carbone), il a été montré que la concentration cellulaire totale évolue de la même façon qu'en cuvée, c'est-à-dire que la concentration en biomasse augmente beaucoup au départ puis se stabilise par la suite. Le taux de dégradation est de 2.4 ppm PCP/h entre 25 et 50 ppm de PCP tandis que le taux spécifique est de  $1.5 \times 10^{-11}$  mg PCP/cellule.h entre 25 et 75 ppm. Lorsque du glucose est ajoutée initialement au milieu de culture comme la



concentration cellulaire totale augmente, la dégradation du PCP est plus rapide avec un taux de 5.5 ppm PCP/h ou de façon spécifique, à  $2 \times 10^{-12}$  mg PCP/cellule.h.

La comparaison globale des deux stratégies de préparation de l'inoculum et des deux types de procédés indique qu'une eau contaminée au PCP devrait être traitée en cuvée alimentée, en ajoutant initialement du glucose dans le milieu de culture.

## ABSTRACT

The objectives of this work were to adapt a mixed culture in chemostat for the degradation of pentachlorophenol (PCP) and to study the influence of inoculum preparation on the degradation and mineralization of aqueous PCP. Two methods of inoculum preparation were studied, a direct inoculation from the chemostat and a preparation made with the addition of glucose. Batch and fed-batch cultures were used to compare these two different inoculums on the basis of the length of the lag phase prior to PCP degradation, biomass evolution, specific and non specific PCP removal rates. Fed-batch experiments were used to simulate continuous culture since wash-out of the biomass can be expected at high dilution rates.

In batch culture, when the flasks were inoculated directly from the chemostat, the developed mixed culture, called consortium A, could degrade up to 800 ppm of PCP. A study showed that  $^{14}\text{C}$ -PCP was mineralized with a  $^{14}\text{CO}_2$  conversion of 70%. This conversion is similar to the literature values. The length of the lag phase observed before degradation increases with the initial PCP concentration but not proportionally: the time needed for the induction of the enzymes responsible for the degradation seems longer depending

on the PCP concentration. The total cellular concentration increases at the beginning of PCP degradation and then stabilizes. However, the microorganisms which specifically degrade PCP, grow mainly during the degradation. This growth does not effect the total concentration of biomass, since the number of cells specific to PCP degradation is very low compared to the total cells ( $10^{-3}$  to  $10^{-4}\%$ ). When PCP is the sole carbon source, the removal rate increases between 50 and 500 ppm with values between 2.5 and 11 ppm PCP/h. However, the specific degradation rate is zero order in that same range, with an average value of  $2.5 \times 10^{-11}$  mg PCP/cell.h.

The use of a co-substrate in inoculum preparation will result in an increase of the total concentration of biomass. In batch culture, when glucose is added in the inoculum, the lag decreases when the initial cellular concentration increases but is longer than observed in the absence of glucose. This result can be explain by a change in the population of the microorganisms when a readily metabolizable substrate like glucose is added to the medium. No variation of the total concentration of biomass was observed during the experiment since little carbon was available (50 ppm of PCP) to the cells in the medium. The removal rate of PCP increases with the initial cellular concentration with values between 0.17 and 2.5 ppm PCP/h. However, these cells degrade the same amount

of PCP with time, since the specific rate is zero order, with a value of  $4.4 \times 10^{-13}$  mg PCP/cell.h, when initially there is between  $1.4 \times 10^8$  and  $3.5 \times 10^9$  cell/mL. The specific and non-specific rates are less than the ones obtained when the medium is directly inoculated from the chemostat.

For a fed-batch culture, regardless of the method of preparation of inoculum, a lag is observed only for the degradation of the first 50 ppm of PCP. The enzymes are induced during that period and when more PCP is added to the medium, it is immediately degraded. When PCP is the sole carbon source, it has been shown that the evolution of the total cellular concentration is the same as the one seen in batch culture, that is, high growth at the beginning and then stabilization. The degradation rate is 2.4 ppm PCP/h between 25 and 50 ppm of PCP while the specific rate is  $1.5 \times 10^{-11}$  mg PCP/cell.h between 25 and 75 ppm. When glucose is initially added to the medium, since the total cellular concentration increases, PCP is rapidly degraded with a removal rate of 5.5 ppm PCP/h or specifically at  $2 \times 10^{-12}$  mg PCP/cell.h.

The results of this study indicate that a PCP contaminated water should be treated in fed-batch reactor and that glucose should be added initially to the medium.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier M. Raymond Mayer de m'avoir donné l'opportunité depuis quelques années de travailler dans son groupe de recherche et pour son support financier, M. Claude Chavarie pour ses conseils judicieux lors de l'interprétation des résultats et la rédaction de ce mémoire, Mme. Juliana Ramsay pour son intérêt soutenu depuis le début de ce projet: son expertise en microbiologie et en recherche a été indispensable lors de la réalisation des travaux.

Merci à toute l'équipe de BIOPRO, plus spécifiquement les membres du projet "SOL": Jean-Louis, François, Ghislain, Gino, Cheikh, Josée, Pierre, Marie-Claude, Sylvie et Alain.

Un gros merci à ma famille: Jacques, Monique, Jo-Ann, André, BB, Susan, Paul et Christophe; spécialement à mes parents, de m'avoir supportée, dans tous les sens du terme, durant toutes ces années et à Christophe pour son aide précieuse, sa patience, ses conseils et ses nombreux encouragements.

## TABLE DES MATIÈRES

	Page
DÉDICACE.....	iv
SOMMAIRE.....	v
ABSTRACT.....	ix
REMERCIEMENTS.....	xii
TABLE DES MATIÈRES.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxi
LISTE DES NOTATIONS ET DES SYMBOLES.....	xxiii
LISTE DES ANNEXES.....	xxvi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1.1 PHÉNOMÈNES ABIOTIQUES.....	6
1.2 OXYDATION BIOLOGIQUE.....	7
1.2.1 Métabolisme du PCP.....	7
1.2.1.1 Récalcitrance.....	7
1.2.1.2 Séquences de dégradation du PCP.....	9
1.2.1.2.1 Dégradation anaérobie du PCP.....	9
1.2.1.2.2 Dégradation aérobie du PCP	11
1.2.1.3 Influence des facteurs physiques et environnementaux.	12

1.2.2 Isolement de microorganismes.....	13
1.2.3 Adaptation des microorganismes....	15
1.2.4 Dégradation en cuvée du PCP.....	18
1.2.4.1 Croissance des microorganismes	18
1.2.4.2 Latence.....	20
1.2.5 Effet d'un co-substrat sur la dégradation.....	21
1.2.6 Cinétique.....	23
1.2.6.1 Effet de la concentration en PCP sur le taux de croissance.	23
1.2.6.2 Immobilisation des cellules...	24
1.2.6.3 Modèles cinétiques.....	25
1.2.6.3.1 Modèle de Monod.....	25
1.2.6.3.2 Modèle d'ordre un.....	28
1.2.6.3.3 Modèle de Haldane.....	28
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1 CULTURES MICROBIENNES POUVANT DÉGRADER LE         PCP.....</b>	<b>32</b>
2.1.1 Souches pures.....	32
2.1.2 Développement de consortiums.....	33
2.1.2.1 Consortium A.....	33
2.1.2.2 Consortium B.....	35
<b>2.2 MÉTHODES ANALYTIQUES.....</b>	<b>37</b>
2.2.1 PCP.....	37
2.2.2 Glucose.....	38

2.2.3 Biomasse.....	40
2.3 EXPÉRIENCES DE DÉGRADATION DU PCP.....	41
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	43
3.1 CHOIX D'UNE CULTURE MICROBIENNE POUR DÉGRADER LE PCP.....	43
3.1.1 Souches pures.....	43
3.1.2 Consortiums.....	48
3.1.2.1 Effet de la concentration initiale en PCP sur la croissance microbienne.....	49
3.1.2.1.1 Consortium A.....	50
3.1.2.1.2 Consortium B.....	52
3.1.2.2 Effet de la concentration initiale en PCP sur sa dégradation.....	53
3.1.2.2.1 Consortium A.....	54
3.1.2.2.2 Consortium B.....	56
3.1.2.3 Comparaison des consortiums...	56
3.2 MINÉRALISATION DU PCP.....	58
3.3 STRATÉGIE D'INOCULATION.....	60
3.3.1 Préparation d'un inoculum avec ajout d'un co-substrat.....	63
3.4 EXPÉRIENCES EN CUVÉE.....	72
3.4.1 PCP comme seule source de carbone.	72
3.4.1.1 Évolution de la biomasse.....	73



3.4.1.2 Évolution de la concentration en PCP.....	78
3.4.2 Effet d'un ajout de glucose dans l'inoculum sur la dégradation du PCP.....	82
<b>3.5 EXPÉRIENCES EN CUVÉE ALIMENTÉE.....</b>	<b>90</b>
3.5.1 Évolution de la biomasse.....	91
3.5.2 Évolution de la concentration en PCP.....	93
<b>3.6 COMPARAISON DES ESSAIS EN CUVÉE ET EN CUVÉE ALIMENTÉE.....</b>	<b>104</b>
3.6.1 Taux de dégradation non-spécifique du PCP.....	105
3.6.2 Taux spécifique de dégradation du du PCP.....	108
3.6.3 Procédé proposé pour le traitement d'une eau contaminée au PCP.....	110
<b>CHAPITRE 4 : CONCLUSION.....</b>	<b>113</b>
<b>RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>122</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>124</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>135</b>

## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1: Séquences de dégradation du PCP....	10
Figure 1.2: Courbe de croissance des microorganismes en cuvée.....	19
Figure 1.3: Relation entre le taux de croissance spécifique et la concentration en substrat selon l'équation de Monod..	26
Figure 1.4: Relation entre le taux de dégradation spécifique et la concentration en substrat selon l'équation de Haldane.....	30
Figure 2.1: Adaptation du consortium A.....	36
Figure 3.1: Dégradation en flacon du glucose et du PCP par <i>Pseudomonas cepacia</i> .....	46
Figure 3.2: Effet de la concentration initiale en PCP sur sa dégradation par le consortium A (A) et B (B).....	55
Figure 3.3: Exemple de minéralisation de 50 ppm de PCP par le consortium A.....	61
Figure 3.4: Préparation d'inoculums avec glucose	64
Figure 3.5: Suivi de la biomasse totale (A), du glucose et du PCP (B) pour l'inoculum 3.....	66

Figure 3.6:	Suivi du PCP pour trois inoculums différents avec glucose ainsi que pour la fiole expérimentale s'y rattachant. Le témoin a été inoculé directement du chemostat A.....	68
Figure 3.7:	Suivi du PCP (A) et de la biomasse totale (B) lorsqu'inoculé directement du chemostat A.....	74
Figure 3.8:	Dégradation du PCP (A), évolution de la biomasse totale et spécifique (B) lorsqu'inoculé directement du chemostat A.....	76
Figure 3.9:	Latence moyenne observée avant la dégradation du PCP.....	79
Figure 3.10:	Taux de dégradation spécifique et non-spécifique du PCP lorsqu'inoculé directement du chemostat A.....	81
Figure 3.11:	Dégradation du PCP par différentes concentrations initiales en biomasse (A) et évolution de la biomasse totale (B) (inoculum préparé avec glucose).....	84
Figure 3.12:	Comparaison des latences avec et sans glucose dans l'inoculum.....	85

Figure 3.13: Taux de dégradation spécifique et non-spécifique du PCP pour différentes concentrations initiales en biomasse (inoculum préparé avec glucose).....	87
Figure 3.14: Dégradation du PCP (A) et évolution de la biomasse totale (B) en cuvée alimentée avec ajouts de 50 ppm de PCP.....	92
Figure 3.15: Dégradation du PCP en cuvée alimentée avec ajouts de 50 ppm de PCP (deuxième essai).....	96
Figure 3.16: Dégradation du PCP en cuvée alimentée avec ajouts de 100 ppm de PCP.....	98
Figure 3.17: Dégradation du PCP en cuvée alimentée avec ajouts de 100 ppm de PCP (présence de glucose avec les 50 ppm de PCP de départ).....	99
Figure 3.18: Dégradation du PCP en cuvée alimentée avec ajouts de 150 ppm de PCP.....	101
Figure 3.19: Dégradation du PCP en cuvée alimentée avec ajouts de 200 ppm de PCP.....	103

Figure 3.20:	Comparaison des taux de dégradation du PCP en cuvée et en cuvée alimentée en présence (+) ou en absence (-) de glucose initialement.	106
Figure 3.21:	Comparaison des taux spécifiques de dégradation du PCP en cuvée en cuvée alimentée en présence (+) ou en absence (-) de glucose initialement.	109
Figure 4.1:	Résumé des résultats en cuvée.....	114
Figure 4.2:	Résumé des résultats en cuvée alimentée.....	115

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1.1: Microorganismes pouvant dégrader le PCP.....	14
Tableau 1.2: Constantes biocinétiques pour le PCP	31
Tableau 2.1: Milieu de sels minéraux.....	34
Tableau 2.2: Concentrations d'alimentation des chemostats.....	35
Tableau 2.3: Liste des métabolites recherchés par l'analyse au CG/SM.....	39
Tableau 3.1: Effet de la concentration initiale en PCP sur la croissance microbienne du consortium A.....	51
Tableau 3.2: Effet de la concentration initiale en PCP sur la croissance microbienne du consortium B.....	53
Tableau 3.3: Comparaison des consortiums.....	57
Tableau 3.4: Comparaison de mesures de PCP au spectrophotomètre (à 319 nm) et au CG/SM.....	59
Tableau 3.5: Valeurs des $r_i$ , $q_i$ , X totales et spécifiques pour les trois préparations différentes d'inoculum avec co-substrat et un flacon témoin	70

Tableau 3.6:	Rapport $X_{\text{spéc}}/X_{\text{totale}}$ pour la	
	dégradation de 50 ppm de PCP comme	
	seule source de carbone.....	77
	X moyenne lors de la dégradation de	
Tableau 3.7:	50 ppm de PCP par des X initiales	
	différentes.....	89

## LISTE DES NOTATIONS ET SYMBOLES

A600	: Densité optique à 600 nm
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ATCC	: "American Type Culture Collection"
ATP	: Adénosine triphosphate
B.C.	: Bouillon de culture ("Nutrient broth")
C	: Concentration (ppm)
C. alim	: Cuvée alimentée
cel.	: Cellule
CG/SM	: Chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse
$^{14}\text{CO}_2$	: Dioxyde de carbone marqué au carbone 14
CP	: Monochlorophénol
$^{14}\text{C}$ -PCP	: Pentachlorophénol marqué au carbone 14
DPM	: Désintégrations par minute
DSM	: "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen"
E	: Enzyme
ES	: Complexe enzyme-substrat
E.L.	: Extrait de levure
Glc	: Glucose (g/L)
h	: Heure
$K_i$	: Constante d'inhibition (masse/volume)
$K_s$	: Constante de saturation (masse/volume)
MENVIQ	: Ministère de l'environnement du Québec



MES	: Matière en suspension (mg/L)
MVES	: Matière volatile en suspension (mg/L)
NPP	: Nombre le plus probable (cellules/mL)
P	: Produit
PCP	: Pentachlorophénol (ppm)
PHB	: Poly- $\beta$ -hydroxybutyrates
ppm	: parties par million (ex. mg/L)
$q_{max}$	: Taux spécifique de dégradation maximale du PCP (masse/cellule.temps)
$q_i$	: Taux spécifique de dégradation du PCP (mg PCP/cellule.h)
$r_i$	: Taux de dégradation du PCP (ppm PCP/h)
S	: Substrat (masse/volume)
S.M.	: Sels minéraux
X	: Biomasse (cellules/mL)
Y	: Coefficient massique de rendement cellules sur substrat

Lettre grecque :

$\mu$	: Taux de croissance spécifique de la biomasse (temps <sup>-1</sup> )
$\mu_{max}$	: Taux de croissance spécifique maximale de la biomasse (temps <sup>-1</sup> )

**Indices :**

inh : Inhibitrice

tox : Toxique

spéc : Spécifique à la dégradation du PCP

## LISTE DES ANNEXES

	Page
Annexe 1: Séquences d'adaptation des souches pures.....	135
Annexe 2: Étude de dégradation du PCP avec différents co-substrats.....	141
Annexe 3: Évolution de la biomasse totale et dégradation du glucose et du PCP pour les inoculums 1 et 2.....	143
Annexe 4: Dégradation du PCP par différentes concentrations initiales en biomasse.....	146

## INTRODUCTION

Le bois est considéré au Canada comme étant la ressource naturelle la plus importante après l'agriculture. Cependant, même si cette ressource est renouvelable, il est important d'un point de vue économique de prolonger la durée de vie des divers produits du bois en les traitant à l'aide de produits chimiques. L'agent de préservation du bois le plus utilisé actuellement est le pentachlorophénol, PCP.

Le PCP est classé comme herbicide, insecticide, fongicide et bactéricide mais son usage premier se retrouve dans les industries de protection et de préservation du bois. L'utilisation du PCP dans ces usines a débuté au Canada en 1963 et environ 1500 tonnes métriques de ce composé sont consommées annuellement.

L'entreposage du bois traité à l'extérieur, à même le sol, entraîne chez les producteurs, vendeurs et utilisateurs une contamination du sol qui peut s'étendre jusqu'à la nappe phréatique. L'étude du comportement du PCP dans la nature devient donc essentiel étant donné l'importance du problème de contamination de l'environnement.

Diverses méthodes existent pour éliminer le PCP des sols

contaminés. Des traitements de solidification/stabilisation, physico-chimiques, thermiques et biologiques sont ceux utilisés actuellement. Malgré la stabilité du PCP soutenu par la présence des cinq atomes de chlore autour du noyau aromatique, le radical hydroxyle tend à faciliter sa dégradation par voie biologique. Les procédés biologiques sont avantageux économiquement lorsque le volume à traiter est grand et que la contamination est faible. De plus, le sol ne perd pas ces propriétés lors de ce traitement. Il peut donc être retourné à son site initial.

La biorémédiation des sols contaminés peut s'effectuer *in-situ* ou en réacteur. Dans les deux cas, il arrive que le sol soit lavé à plusieurs reprises en faisant percoler de l'eau à travers un amas de sol. L'eau devient alors contaminée et elle doit être traitée par la suite. Pour cette raison et parce que la plupart des études cinétiques s'effectuent en milieu liquide, l'étude du comportement du PCP en milieu aqueux est essentielle.

Les objectifs principaux de cette étude sont donc d'adapter des microorganismes pour la dégradation du PCP et d'étudier l'influence de la stratégie de la préparation d'inoculum sur la dégradation et la minéralisation du PCP en milieu aqueux.

Afin de répondre au premier objectif, l'adaptation en chemostat de cultures mixtes provenant de sources contaminées est avantageuse comparativement aux cultures pures, puisque celles-ci peuvent entrer en compétition avec les microorganismes retrouvés naturellement dans des eaux ou des sols contaminés au PCP. De plus, lorsqu'il s'agit de cultures pures recombinaisonnées, une stérilisation complète doit être effectuée après le traitement de l'eau ou du sol contaminé avant leur relâchement dans l'environnement. L'adaptation des microorganismes est essentielle pour induire les enzymes responsables de la dégradation du PCP.

Deux stratégies d'inoculation sont étudiées, soit une inoculation directe à partir du chemostat, le PCP est alors la seule source de carbone, et la préparation d'un inoculum dont la concentration cellulaire est augmentée par l'ajout d'un co-substrat. Afin de comparer ces deux stratégies d'inoculation, deux types de procédés ont été utilisés, soit un traitement en cuvée et un traitement en cuvée alimentée. Le traitement en cuvée alimentée est utilisé pour simuler une culture en continu puisqu'à des taux de dilution élevés, un lavage de la biomasse peut se produire.

Les critères de comparaison sont la durée de la latence observée avant la dégradation, l'évolution de la concentration

cellulaire et les taux de dégradation spécifiques et non-spécifiques du PCP.

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La disparition du PCP en milieu aqueux peut se produire par des phénomènes abiotiques ou par une oxydation biologique. Lors de cette étape, le PCP peut être dégradé en des molécules plus simples et moins toxiques ou il peut être minéralisé, c'est-à-dire que les carbones se retrouvent totalement sous forme de  $\text{CO}_2$ . Une minéralisation complète des polluants organiques est toujours visée.

Le PCP démontre une certaine récalcitrance face à une attaque enzymatique qui est reliée à des facteurs d'ordre chimiques et biologiques. Toutefois, une dégradation peut se produire en présence ou non d'oxygène. Le mode de culture (anaérobie ou aérobie) a un effet sur les métabolites produits ainsi que les étapes empruntées pour dégrader le PCP. Des facteurs physiques et environnementaux, tels le pH et la température, influencent également l'oxydation biologique du PCP. Cette oxydation peut être effectuée par des souches pures ou des cultures mixtes provenant de divers milieux. L'adaptation de ces microorganismes est l'étape initiale dans laquelle l'induction des enzymes responsables du métabolisme du PCP est réalisée.

Lors de la dégradation du PCP, une latence est parfois



observée avant le début de la disparition du composé. L'ajout d'un co-substrat facilement assimilable permet dans certains cas d'éliminer cette phase de latence et d'améliorer le taux de dégradation du PCP. La toxicité de ce produit envers les microorganismes a un effet direct sur sa cinétique d'enlèvement et de minéralisation. Celles-ci diffèrent si les cellules sont immobilisées ou non et sont modélisées à l'aide de différentes équations. Les modèles de Monod, d'ordre un et de Haldane sont les plus utilisés.

Ces divers sujets influençant la biodégradation du PCP en milieu aqueux ont été étudiés par plusieurs auteurs. Leurs résultats et conclusions sont résumés dans les pages suivantes.

### **1.1 PHÉNOMÈNES ABIOTIQUES**

L'oxydation microbiologique et certains phénomènes abiotiques sont les mécanismes qui régissent l'enlèvement du PCP en milieu aqueux. La photodégradation, l'oxydation chimique, la volatilisation ainsi que la sorption du PCP peuvent fausser les résultats en laissant croire que la disparition du polluant est due uniquement à une dégradation biologique.

La volatilisation et la sorption semblent être les deux

phénomènes abiotiques les plus importants. Toutefois, lors d'une étude en continu, Moos et al. (1983) ont démontré qu'en milieu aérobie la sorption du PCP sur la biomasse était faible comparativement à l'enlèvement biologique tandis que la volatilisation était non-significative. Des résultats similaires ont été observés en conditions anaérobies (Guthrie et al., 1984).

Il ne faut toutefois pas écarter ces phénomènes lors d'essais de biodégradation.

## **1.2 OXYDATION BIOLOGIQUE**

### **1.2.1 Métabolisme du PCP**

#### **1.2.1.1 RÉCALCITRANCE**

La résistance de certains produits, tel le PCP, face à une attaque enzymatique, puisque la biodégradation de ces composés est effectuée par des enzymes, est reliée à plusieurs facteurs d'ordre chimique et biologique. L'encombrement stérique, la charge et la stéréochimie de la molécule, la présence de liens stables, le nombre ainsi que le type et la position des substituants sont quelques facteurs d'ordre chimiques reliés à la récalcitrance. De plus, des concentrations trop faibles

ou trop élevées du produit, une solubilité inadéquate ou trop lente dans l'eau ou des phénomènes d'adsorption expliquent également la persistance de certains composés dans l'environnement.

Fewson (1991) rapporte une étude dans laquelle plusieurs experts dans le domaine de la biodégradation ont analysé le site initial d'attaque et les taux de dégradation de certains produits chimiques. L'influence de la structure moléculaire sur la dégradabilité a entre autre été étudiée. Les conclusions de ce travail indiquent que le groupement hydroxyle favorise la biodégradation aérobie tandis que l'halogénéation a une influence négative dans ces mêmes conditions mais représente un site d'attaque préférentiel en conditions anaérobies. Tel est le cas du PCP qui est formé d'un groupement hydroxyle et de cinq chlores autour du noyau aromatique.

Le caractère récalcitrant du PCP peut également s'expliquer par certains facteurs biologiques. L'absence d'organismes ou d'enzymes appropriés, des problèmes d'induction ou de transport membranaire, la production d'intermédiaires toxiques, une acclimatation ou adaptation inadéquate résument les causes biologiques qui influencent la dégradation de certains produits chimiques, tel le PCP.

Il est donc essentiel lors d'un traitement biologique d'un composé récalcitrant, de bien déterminer les causes chimiques et biologiques qui peuvent limiter sa biodégradabilité.

#### 1.2.1.2 SÉQUENCES DE DÉGRADATION DU PCP

Les diverses séquences empruntées lors de la dégradation du PCP sont illustrées à la figure 1.1. Selon que la dégradation s'effectue en conditions anaérobie ou aérobie, les étapes qui conduisent à la dégradation ou à la minéralisation du PCP ainsi que les métabolites formés diffèrent. Les paragraphes suivants expliquent ces différences.

##### 1.2.1.2.1 Dégradation anaérobie du PCP

La dégradation anaérobie (en absence d'oxygène) des composés chlorés est une déchloration où les atomes de chlores sont enlevés avant de scinder le noyau benzénique. Cette déchloration permet d'obtenir des composés moins toxiques, plus solubles et moins récalcitrants à la dégradation.

Les composés faiblement chlorés, tels les mono-chlorophénols, peuvent subir une minéralisation complète en conditions anaérobies. Par contre, les composés hautement halogénés, tel le PCP, sont complètement ou partiellement déchlorés lors d'un

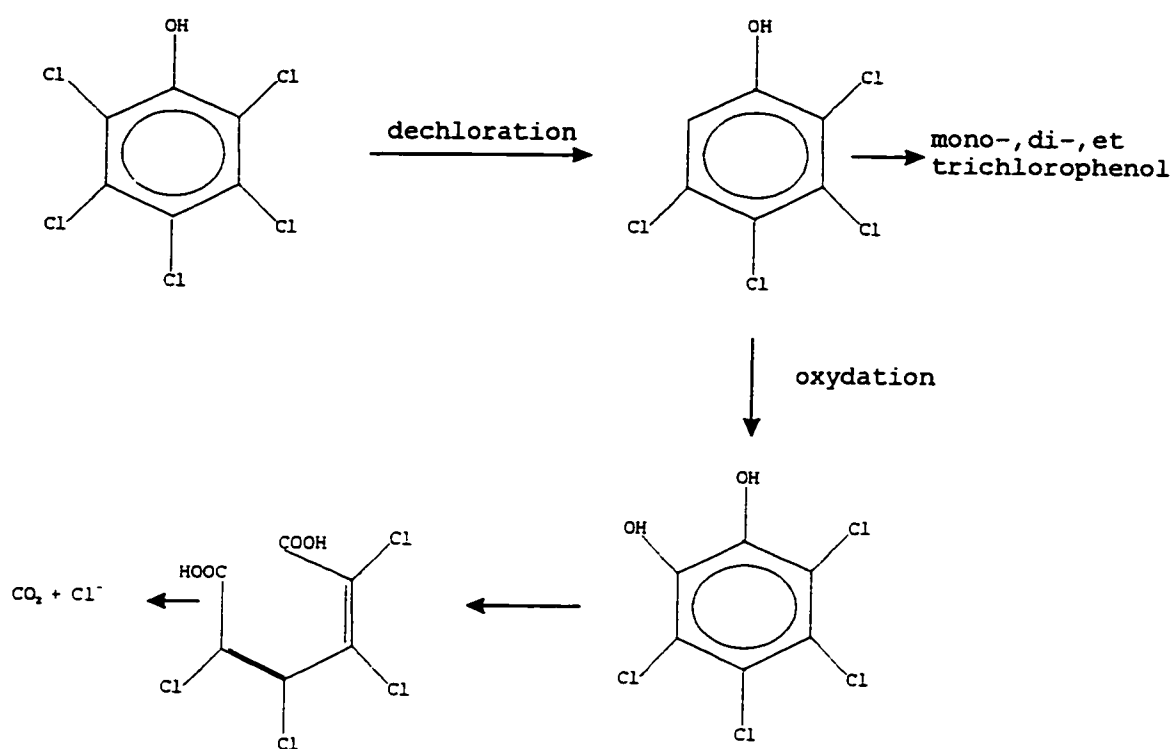


Figure 1.1: Séquences de dégradation du PCP

traitement anaérobie, mais pas nécessairement minéralisés. Pour ces produits, l'enlèvement du chlore à la position ortho semble s'effectuer plus rapidement (Mikesell et Boyd, 1986). Les produits intermédiaires de dégradation identifiés sont le 2,3,4,5 et le 2,3,5,6-tétrachlorophénol, le 3,4,5 et le 2,3,5-trichlorophénol et le 3,5-dichlorophénol (Bryant et al., 1991; Larsen et al., 1991).

Lorsque les composés halogénés sont partiellement déchlorés, un deuxième traitement, aérobie celui-là, est nécessaire afin d'obtenir une minéralisation complète.

#### 1.2.1.2.2 Dégradation aérobie du PCP

Lors d'un traitement aérobie, donc en présence d'oxygène, la dégradation du PCP s'effectue en deux grandes étapes. En premier lieu, une déchloration s'effectue préférentiellement à la position ortho. Par la suite, un groupement hydroxyle est ajouté au composé pour former le tétrachlorocathécol et permettre au noyau de se scinder et éventuellement de libérer du  $\text{CO}_2$ . Les sous-produits générés appartiennent aux classes des chlorophénols (mono-, di-, tri- et tétra-chlorophénol), anisoles, benzenediols, méthoxyphénols, diméthoxybenzenes, benzoquinones et acétates de phényl (Kaufman 1978; Rott et al., 1979; Ruckdeschel et al., 1987).

### 1.2.1.3 INFLUENCE DES FACTEURS PHYSIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX

La biodégradation du PCP est influencée par certains facteurs physiques et environnementaux tel le pH et la température.

Le pH affecte l'oxydation biologique du PCP à divers niveaux. Premièrement, si le pH du milieu est acide, le PCP se retrouve sous forme non-dissociée. Par contre, à pH basique, l'ion phénolate est plutôt retrouvé. Il a été montré que le PCP non-dissocié est plus toxique aux microorganismes que l'ion phénolate (Stanlake et Finn, 1982; Smith et al., 1987). Cet effet toxique est principalement dû au fait que ce composé est reconnu comme étant un découpleur lors de la phosphorylation oxydative. Le transfert d'électrons s'effectue mais la production d'ATP est inhibée. Deuxièmement, la sorption de l'ion phénolate est de 15 à 30 fois plus faible que celle de la molécule non-dissociée (Bellin et al., 1990; Boyd et al., 1989). En dernier lieu, la solubilité du composé étudié peut parfois être un facteur limitant lors d'étude de biodégradabilité. Pour ces diverses raisons, il est donc avantageux de travailler en milieu neutre, voire même un peu basique, afin de favoriser l'ionisation. Un pH entre 6.8 et 8.2 permet d'obtenir une dégradation optimale du PCP (Stanlake et Finn, 1982; Brown et al., 1986; Crawford, 1987).

La température permettant d'obtenir une croissance microbienne optimale se situe entre 20 et 37 degrés Celcius (Hakulien et Salonen, 1981; Crawford et Mohn, 1985; Mikesell et Boyd, 1986; Radehaus et Schmidt, 1992). À des températures excédant ou n'atteignant pas cette plage, aucune minéralisation significative n'est observée. Les bactéries dégradant le PCP sont donc classifiées comme étant mésophiles.

#### **1.2.2 Isolement de microorganismes**

La biodégradation du PCP peut s'effectuer par des cultures mixtes non-définies, c'est-à-dire des consortiums (Hakulinen et al., 1981; Moos et al., 1983; Klecka et Maier, 1985) ou par des cultures pures. En effet, plusieurs études ont démontré que certaines souches avaient la capacité de dégrader partiellement ou totalement le pentachlorophénol. L'isolement de ces microorganismes a permis de les identifier et de les répertorier (voir tableau 1.1).

Ces souches ont été isolées à partir de milieux contenant du PCP ou ayant été préalablement en contact avec le polluant, tels des sols contaminés au PCP (Rutgers et al., 1991; O'Reilly et Crawford, 1989), des rizières et des boues d'épuration d'usine de préservation du bois (Häggblom et al., 1988).



Tableau 1.1 : Microorganismes pouvant dégrader le PCP.

Microorganisme	Références
<i>Flavobacterium</i>	Crawford et Mohn, 1985
<i>Arthrobacter</i>	Chu et Kirsch, 1972; Stanlake et Finn, 1982
<i>Pseudomonas</i>	Watanabe, 1973; Radehaus et Schmidt, 1992
<i>Rhodococcus</i>	Häggbloom et al., 1988
<i>Mycobacterium</i>	Häggbloom et al., 1988
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Rott et al., 1979
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Rott et al., 1979
<i>Corynebacterium</i>	Rott et al., 1979
<i>Phanerochaete</i>	Lin et Wang, 1989
<i>Trichoderma</i>	Cserjesi et Johnson, 1972

Cependant, certains auteurs ont démontré que quelques microorganismes pouvaient dégrader le PCP sans qu'il y ait eu un contact préalable avec le polluant. Les boues d'épuration d'effluents municipaux (Melcer et Bedford, 1988; Kim et Maier, 1986) ainsi que des sols de jardin (Mikesell et Boyd, 1988)

sont deux exemples de milieu exempt de PCP mais dont les bactéries présentes ont pu être adaptées à dégrader le composé aromatique chloré.

### **1.2.3 Adaptation des microorganismes**

La biodégradation du PCP s'effectue par une réaction enzymatique. Les gènes codant les enzymes responsables de réactions cataboliques, telle la dégradation du PCP, se retrouvent souvent sur des plasmides. Un plasmide est un ensemble circulaire de gènes extrachromosomiques constitué de deux brins d'ADN. Lorsque le taux de croissance d'une cellule contenant un plasmide est élevé, il se peut que la réplication de ce dernier ne se produise pas aussi rapidement que la division cellulaire. Dans ce cas, il y aura de moins en moins de cellules avec plasmide, donc moins de cellules pouvant dégrader le substrat voulu.

Une adaptation des microorganismes est essentielle afin d'induire les enzymes responsables du métabolisme du PCP. Cette étape consiste à faire croître les organismes isolés en présence d'un composé qui induira ces enzymes afin d'augmenter leur tolérance ainsi que leur pouvoir de dégradation envers le polluant. La présence de ce produit permet également d'inhiber la croissance d'organismes ne possédant pas le

plasmide dont les gènes codent les enzymes responsables de la dégradation du PCP. C'est ce que l'on appelle la pression sélective.

Le PCP est le composé le plus utilisé comme inducteur. Par contre d'autres composés tels le 2,4,6-trichlorophénol et le 2,3,5,6-tétrachlorophénol peuvent induire les enzymes responsables de la dégradation du PCP (Steiert et al., 1987).

Peu importe l'inducteur choisi, ce qui semble important est la présence continue de celui-ci auprès des microorganismes isolés afin de créer une pression sélective comme mentionnée précédemment. Häggblom et al. (1988) ont observé pour les souches *Rhodococcus* et *Mycobacterium* une perte de l'activité catabolique envers les chlorophénols lorsque sous-cultivées plusieurs fois en l'absence du substrat inducteur. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle les gènes codant pour les enzymes permettant de dégrader les chlorophénols soient de nature plasmidique. Saber et Crawford (1985) ont d'ailleurs isolé un premier plasmide de 80 à 100 kilobases et possiblement un deuxième d'environ 200 kilobases chez diverses souches de *Flavobacterium* provenant de sols contaminés au PCP. De plus, il a été montré que les gènes responsables de la dégradation de certains composés aromatiques, tels l'anthracène et le phénantrène, étaient

également de nature plasmidique (Menn et al., 1993, Sanseverino et al., 1993).

L'adaptation de la flore microbienne isolée s'effectue majoritairement par un mode de culture en continu. De cette façon, une concentration élevée en PCP peut être alimentée au chemostat sans créer de choc aux microorganismes puisque la concentration à l'intérieur du réacteur reste faible. En effet, Edgehill et Finn (1982) ont pu développer une culture dense avec une concentration d'alimentation aussi élevée que 915 mg/L de PCP comme seule source de carbone. Cependant, des concentrations en PCP de l'ordre de 100 ou 250 ppm sont plus souvent rencontrées (Kim et Maier, 1986; Topp et al., 1988).

Certaines adaptations sont toutefois effectuées en cuvée dans des flacons agités, à partir de cellules maintenues sur pétri. Les cellules sont transférées à un milieu liquide de sels minéraux et, comme seule source de carbone, du PCP (Radehaus et Schmidt, 1992) ou un substrat facilement assimilable comme le glutamate. Dans ce cas, les cellules sont induites pour la dégradation du PCP en ajoutant une certaine quantité de ce dernier lorsque la croissance microbienne est en phase exponentielle. Lorsque tout le PCP est dégradé, les cellules sont considérées comme induites (Crawford et Mohn, 1985). Parfois, deux ajouts de PCP sont effectués avant l'inoculation

des fioles expérimentales (Gonzalez et Hu, 1991).

La stratégie d'adaptation de la flore microbienne a également une incidence importante sur l'induction des enzymes. Mikesell et Boyd (1986) ont démontré qu'un mélange de trois boues anaérobies acclimatées individuellement à l'un des trois isomères de mono-chlorophénol dégradait complètement le PCP. Ce type de stratégie d'acclimatation assure la déchloration à toutes les positions autour du noyau aromatique et ce plus rapidement que lorsqu'acclimaté à un seul mono-chlorophénol ou aux trois simultanément.

#### **1.2.4 Dégradation en cuvée du PCP**

##### **1.2.4.1 CROISSANCE DES MICROORGANISMES**

Il est bon de rappeler que la croissance des microorganismes en cuvée suit généralement la courbe représentée à la figure 1.2.

Monod a divisé cette courbe en six phases bien définies:

1. Phase de latence : adaptation au nouvel environnement, temps de génération très élevé, aucune croissance;
2. Phase d'accélération : diminution du temps de génération, début de la croissance;

3. Phase exponentielle : temps de génération minimal et constant, taux de croissance spécifique constant et maximal, taux de dégradation maximal du substrat;
4. Phase de déclin de la croissance : augmentation du temps de génération et diminution du taux de croissance spécifique;
5. Phase stationnaire : équilibre entre la croissance et la mortalité des cellules;
6. Phase endogène : taux de mortalité élevé, lyse des cellules.

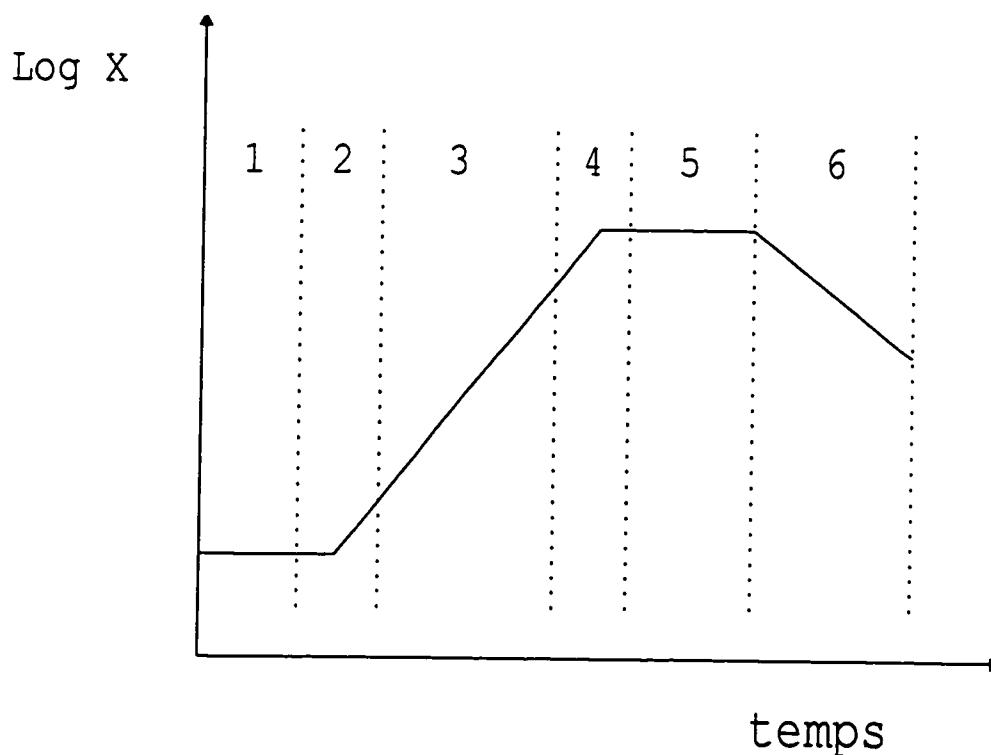


Figure 1.2 : Courbe de croissance des microorganismes en cuvée.

Pour un système en continu, les microorganismes sont maintenus en phase exponentielle puisque le milieu de culture est constamment renouvelé.

#### 1.2.4.2 LATENCE

Malgré des étapes d'acclimatation de la biomasse, une phase de latence est souvent observée avant la dégradation du PCP en conditions aérobies et anaérobies. Durant cette période, les cellules ne consomment pas le PCP ou tout autre source de carbone disponible. Certains facteurs, tel la concentration initiale en PCP, le nombre de cellules et la présence d'une source de carbone facilement assimilable, peuvent influencer la durée de la phase de latence.

Gonzalez et Hu (1991) ainsi que Stanlake et Finn (1982) ont démontré que la phase de latence d'une culture en cuvée augmentait proportionnellement avec la concentration initiale en PCP lorsque celle-ci était inférieure à 200 ppm pour une souche de *Flavobacterium* et à 300 ppm pour une souche d'*Arthrobacter*. Par contre, aucun effet perceptible du nombre de cellules sur la latence n'a été observé dans la plage étudiée (Stanlake et Finn, 1982).

Une réduction de la latence est observée lorsqu' une souche de

*Flavobacterium* est alimentée d'une source de carbone facilement assimilable telle le glutamate de sodium, l'aspartate, le succinate de sodium, l'acétate de sodium, le glucose et la cellobiose (Topp et al., 1988; Gonzalez et Hu, 1991). Ces auteurs ont émis comme hypothèse que la phase de latence résulte d'une perte de viabilité des cellules en présence de PCP et en absence de co-substrat.

#### **1.2.5 Effet d'un co-substrat sur la dégradation**

Le taux de dégradation du PCP est directement relié au nombre de cellules pouvant dégrader le polluant. Afin d'accroître la concentration microbienne, il faut augmenter l'apport en carbone. Toutefois, il ne faut pas fournir aux bactéries une concentration élevée en PCP puisque sa toxicité fait en sorte que seules les solutions relativement diluées peuvent être dégradées lorsque le PCP est la seule source de carbone et d'énergie. L'ajout d'une source de carbone non toxique, donc facilement assimilable, permet alors d'augmenter le nombre de bactéries et d'améliorer la dégradation du PCP.

Les cellules en présence de plus d'un substrat dans leur milieu de culture peuvent ou non préférer une des sources de carbone. En fait, le mode de culture des microorganismes détermine si les substrats seront consommés simultanément ou



séquentiellement. Lorsque le taux de croissance des cellules est élevé, une dégradation séquentielle est prévue et si le taux de croissance est faible, les substrats seront consommés simultanément. Par exemple, lors d'une culture en cuvée ou en cuvée alimentée où l'ajout d'une nouvelle source de carbone s'effectue lorsque le substrat précédent est tout dégradé, les microorganismes sont privés de nourriture pour un certain temps. Lorsqu'un substrat est ajouté, les microorganismes vont l'assimiler rapidement et le taux de croissance sera alors élevé. Par contre, lors d'une culture en continu, les microorganismes sont exposés à des concentrations plus ou moins constantes des divers substrats. Le taux de croissance est alors faible et la dégradation des composés devrait s'effectuer simultanément (Autenrieth et al., 1991).

Brown et al. (1986) lors d'une étude en continu ont pu alimenter une souche de *Flavobacterium* jusqu'à une concentration de 800 ppm de PCP lorsque de la cellobiose était ajoutée au milieu. Le co-substrat aidait à maintenir la stabilité du système en fournissant à la biomasse une partie du carbone nécessaire. Dans ce cas, le PCP et la cellobiose étaient consommés simultanément.

Comme mentionné précédemment, l'ajout d'un co-substrat au milieu de culture diminue la phase de latence précédant la

dégradation du PCP (Topp et al., 1988; Gonzalez et Hu, 1991). Les co-substrats consommés avant le PCP étaient le glutamate, l'aspartate, le succinate, l'acétate, le glucose et la cellobiose. De plus, le taux de dégradation spécifique du PCP en présence d'une source supplémentaire de carbone est plus élevé, avec une valeur de  $0.92 \times 10^{-13} \pm 0.09 \times 10^{-13}$  g PCP/cellule.h que lorsqu'alimenté en PCP seulement, soit dans ce cas  $1.51 \times 10^{-13} \pm 0.08 \times 10^{-13}$  g PCP/cellule.h (Topp et al., 1988).

Pour leur part, Radehaus et Schmidt (1992) ont déterminé que l'ajout de glucose à un milieu contenant une souche de *Pseudomonas* n'avait aucun effet sur le taux de minéralisation du PCP. Lors de leur expérience en cuvée, le glucose et le PCP étaient utilisés simultanément.

#### 1.2.6 Cinétique

##### 1.2.6.1 EFFET DE LA CONCENTRATION EN PCP SUR LE TAUX DE CROISSANCE

La cinétique d'enlèvement et de minéralisation du PCP est directement reliée à sa toxicité envers les microorganismes. La toxicité du PCP est déterminée en observant le taux de croissance de la biomasse. Lorsque le PCP devient toxique, le

taux de croissance chute. Pour une souche d'*Arthrobacter*, le PCP est toxique à 130 mg/L. Stanlake et Finn (1982) ont observé qu'au départ le taux de croissance augmentait avec la concentration initiale en PCP, puis, après avoir atteint ce niveau, il diminuait graduellement. Edgehill et Finn (1982) ont trouvé une toxicité similaire pour la même souche puisque le taux de croissance était constant entre 10 et 135 mg/L de PCP avant de chuter. Pour une souche de *Pseudomonas*, le taux de croissance le plus élevé de la biomasse a été atteint lorsque la concentration initiale en PCP était de 40 mg/L (Radehaus et Schmidt, 1992). Klecka et Maier (1984) ont pour leur part déterminé que la toxicité du PCP était de 0.3 mg/L pour une culture mixte. Tout comme les souches pures, l'effet inhibiteur du substrat devient plus prononcé en augmentant la concentration initiale du PCP.

#### 1.2.6.2 IMMOBILISATION DES CELLULES

La cinétique d'enlèvement et de minéralisation du PCP diffèrent si les cellules sont en suspension, immobilisées ou co-immobilisées (Heipieper et al., 1991; Lin et al., 1990). Lorsque les cellules sont immobilisées ou co-immobilisées, le PCP est adsorbé sur le support et la concentration soluble en PCP est maintenue en-deçà de son niveau toxique. L'adsorption du PCP est toutefois réversible et le polluant reste toujours

disponible pour la dégradation. Puisque la toxicité du PCP est réduite par l'immobilisation des cellules, les taux de dégradation et de minéralisation du polluant sont plus élevés.

#### 1.2.6.3 MODÈLES CINÉTIQUES

La dégradation du PCP dans le temps peut être décrite par certains modèles cinétiques. Les équations de Monod (Edgehill et Finn, 1982; Topp et al, 1988; Autenrieth et al., 1991), d'ordre un (Moos et al., 1983) et de Haldane (Stanlake et Finn, 1982; Klecka et Maier, 1985; O'Reilly et Crawford, 1989; Autenrieth et al., 1991; Gonzalez et Hu, 1991; Radehaus et Schmidt, 1992) sont, selon la littérature, les modèles représentant le mieux la dégradation des chlorophénols.

##### 1.2.6.3.1 Modèle de Monod

Certains auteurs modélisent la cinétique de croissance de la biomasse plutôt que le taux global de dégradation d'un composé. L'équation de Monod,

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1.1)$$

quantifie la courbe de croissance classique de la biomasse en incluant les phases de la croissance exponentielle et de mortalité. Le terme  $\mu_{\max}$  (temps<sup>-1</sup>) est la valeur maximale que

peut atteindre le taux de croissance spécifique de la biomasse ( $\mu$ ),  $S$  est la concentration en substrat (masse/volume) et  $K_s$ , la constante de saturation (masse/volume). Cette constante équivaut à la concentration en substrat à  $\mu = \mu_{\max}/2$  (voir figure 1.3).

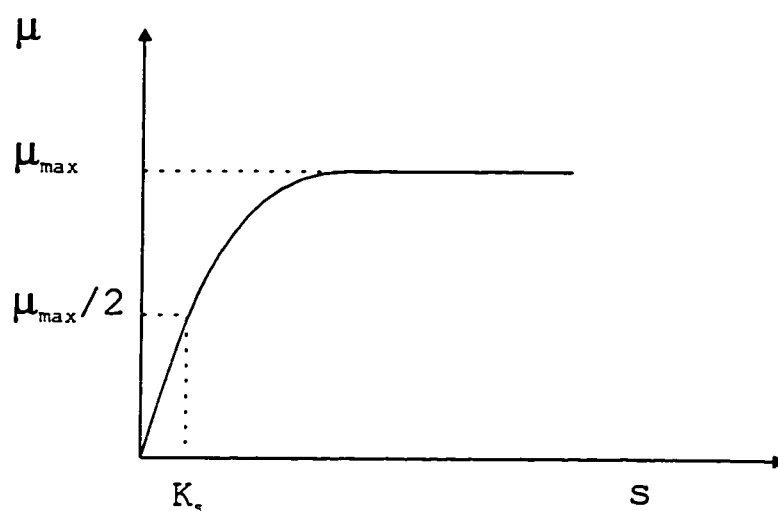


Figure 1.3 : Relation entre le taux de croissance spécifique et la concentration en substrat selon l'équation de Monod.

L'équation de Monod peut être modifiée afin de modéliser le taux de dégradation spécifique du substrat. Pour ce faire, il faut introduire une nouvelle constante : le rendement de la biomasse,  $Y$ . Ce coefficient est défini comme étant le rapport entre la variation de la biomasse et du substrat, soit,

$$Y = \frac{dX}{dS} \quad (1.2)$$

Il est possible de développer une relation entre le taux de croissance spécifique,  $\mu$ , le taux de dégradation spécifique,  $q$ , et le rendement,  $Y$  en remaniant l'équation 1.2 :

$$Y = \frac{(dX/dt)/X}{(dS/dt)/X} \quad (1.3)$$

soit

$$Y = \frac{\mu}{q} \quad (1.4)$$

ou

$$q_s = \frac{\mu}{Y} \quad (1.5)$$

En intégrant la relation 1.5 dans l'équation de Monod, cette dernière devient :

$$q_s = q_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1.6)$$

où  $q_s$  = taux de dégradation spécifique (masse/cellule.temps) ;

$q_{\max}$  = taux de dégradation spécifique maximal  
(masse/cellule.temps) .

Cette relation est similaire à l'équation de Michaelis-Menten définie pour les réactions enzymatiques.

#### 1.2.6.3.2 Modèle d'ordre un

L'expression de Monod se simplifie à une équation d'ordre un lorsque la concentration en substrat est faible par rapport à la constante de saturation. Dans ce cas,  $S$  est négligé au dénominateur et l'expression de Monod est réduite à:

$$\mu = (\mu_{\max} / K_s) S \quad (1.7)$$

ou

$$q_s = (q_{\max} / K_s) S \quad (1.8)$$

Par contre, le modèle d'ordre un, tout comme celui de Monod, ne tient pas compte du caractère inhibiteur du PCP. À des concentrations élevées en PCP, le taux spécifique de dégradation ou de croissance chute et un terme représentant cette inhibition doit être ajouté au modèle cinétique pour bien représenter ce qui se passe. Le modèle de Haldane tient compte de cette inhibition.

#### 1.2.6.3.3 Modèle de Haldane

L'inhibition de la croissance microbienne est souvent due à l'inhibition des systèmes enzymatiques. Généralement, lors d'une réaction enzymatique, une combinaison réversible entre le substrat,  $S$ , et l'enzyme,  $E$ , est formée. Le complexe

enzyme-substrat, ES, est par la suite décomposé de façon irréversible en un produit, P, et une enzyme libre :



Lors d'une inhibition enzymatique, le taux de la réaction catalysée par l'enzyme est réduit car l'inhibiteur se lie avec soit l'enzyme libre et/ou le complexe enzyme-substrat. Une concentration trop élevée en substrat, la présence d'un sous-produit sont deux exemples d'inhibiteur potentiel de la croissance microbienne.

L'équation de Monod peut être modifiée de façon à tenir compte de l'inhibition du substrat à concentration élevée comme observé avec le PCP. Les variables et coefficients de cette équation, connue sous le nom de Haldane, sont définis de la même façon que celle de Monod, soit :

$$q_s = q_{\max} \frac{S}{K_s + S + S^2/K_i} \quad (1.10)$$

où  $K_i$  est la constante d'inhibition (masse/volume). Le terme d'inhibition,  $S^2/K_i$ , est ce qui différencie cette équation de l'expression de Monod.

L'équation de Haldane est la relation qui décrit le mieux la cinétique de dégradation du PCP en milieu aqueux. Dans la



partie non-inhibitrice, la dégradation est parfois modélisée par l'équation d'ordre un (Moos et al., 1983). Mais lorsque l'allure global de la dégradation est considérée, c'est-à-dire la partie non-inhibitrice et inhibitrice, le modèle de Haldane décrit bien le comportement général du PCP (voir figure 1.4).

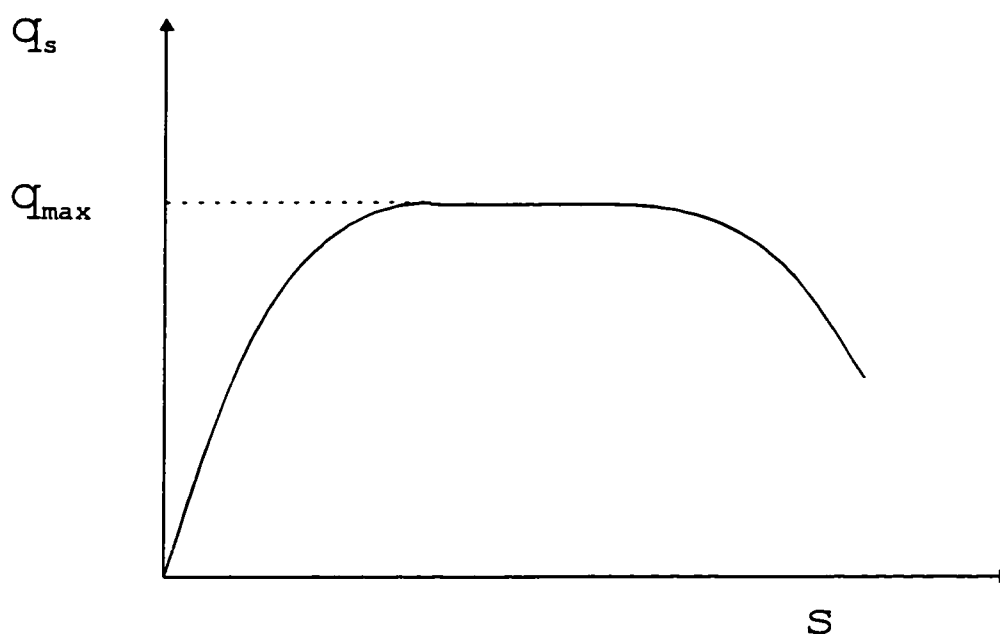


Figure 1.4 : Relation entre le taux de dégradation spécifique et la concentration en substrat selon l'équation de Haldane.

Quelques constantes biocinétiques du PCP en milieu aqueux sont représentées au tableau 1.

Tableau 1.2 - Constantes biocinétiques pour le PCP.

	Klecka et Maier (1985)	Edgehill et Finn (1982)	Topp et al. (1988)	Gonzalez et Hu (1991)
$q_{\max}$ (mg PCP $c^{-1}h^{-1}$ )	-	-	$9.2 \times 10^{-12}$	$2.79 \times 10^{-11}$
$\mu_{\max}$ ( $h^{-1}$ )	0.074	0.154	-	-
$K_s$ (ppm)	0.06	1.12	86.8	3.09
$K_i$ (ppm)	0.001375	-	-	-
$k_d$ ( $h^{-1}$ )	0.002	-	-	-
Y (g/g)	0.136	0.16	-	-
Notes	Culture mixte	<i>Arthrobac-</i> <i>ter</i> ; pour 135ppm de PCP	<i>Flavobacte-</i> <i>rium</i> ; avec glutamate	<i>Flavobac-</i> <i>terium</i> ; avec glutamate

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 CULTURES MICROBIENNES POUVANT DÉGRADER LE PCP

#### 2.1.1 Souches pures

Six souches pures reconnues pour leur habileté à dégrader le PCP ont été obtenues de collections. *Flavobacterium* (ATCC 39723), *Rhodococcus* PCP-I (DSM 43826), *Rhodococcus* CG-I (DSM 5146) et *Rhodococcus* CP-2 (DSM 4598) étaient maintenues initialement sur un milieu de 4 g/L d'extrait de levure et de 4 g/L de glucose en gélose inclinée. *Arthrobacter* (ATCC 33790) était maintenue sur un pétri de 8 g/L de bouillon de culture (nutrient broth) et de 5 g/L d'extrait de levure. Ces colonies provenaient d'un flacon de 4 g/L de bouillon de culture, 2 g/L d'extrait de levure et de 50 ppm de PCP. Des cellules lyophilisées de *Pseudomonas cepacia* (ATCC 17759) ont été transférées sur pétri dont le milieu était constitué de 4 g/L d'extrait de levure, 4 g/L de glucose, avec et sans 50 ppm de PCP. Ces cellules provenaient initialement d'une expérience en chemostat où elles pouvaient dégrader en continu jusqu'à 900 ppm de PCP.

Une adaptation des diverses souches à des milieux solides et liquides en présence de PCP et dont les nutriments étaient de

moins en moins complexes a été effectuée graduellement. Dans un premier temps, les souches étaient transférées à des milieux identiques avec et sans la présence de 50 ppm de PCP. Par la suite, selon leur croissance, une diminution de la concentration en PCP ou des autres nutriments était effectuée d'un transfert à l'autre, jusqu'à l'obtention d'un milieu de sels minéraux avec et sans PCP. Le tableau 2.1 décrit la liste de sels minéraux utilisés comme milieu de croissance.

#### **2.1.2 Développement de consortiums**

Deux consortiums bactériens ont été isolés à partir de sols contaminés afin de sélectionner une microflore capable d'assimiler les chlorophénols comme seule source de carbone. Le consortium A et B proviennent de sources différentes et ont été adaptés de façon différente.

##### **2.1.2.1 CONSORTIUM A**

La flore bactérienne d'un sol d'une usine de préservation de bois a été exposé, au départ en cuvée puis par la suite en continu, aux trois différents isomères de mono-chlorophénol puis au PCP. Cette adaptation permet d'obtenir une déchloration plus efficace aux différentes positions autour du noyau aromatique. Les 2, 3 et 4-chlorophénol étaient

alimentés en continu dans trois réacteurs différents, soit des pots MASON, contenant un même échantillon initial de sol et un milieu de sels minéraux.

Tableau 2.1 : Milieu de sels minéraux.

Sels minéraux	Concentration (g/L)
Solution 1 <sup>1</sup>	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.68
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.73
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1
Solution 2	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03
EDTA	0.05
TES	1 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Les solutions 1 et 2 étaient stérilisées séparément.

<sup>2</sup> en mL/L.

Leurs effluents étaient réunis et dirigés vers un quatrième

réacteur alimenté en PCP et contenant le même échantillon de sol contaminé (voir figure 2.1). Un barreau magnétique assurait l'agitation et un apport d'air continu apportait aux microorganismes l'oxygène nécessaire. Le pH était mesuré en continu à l'aide d'une sonde. Le tableau 2.2 indique les concentrations d'alimentation aux différents chemostats.

Tableau 2.2 : Concentrations d'alimentation des chemostats

Composé	A (ppm)	B (ppm)
2-CP	600	---
3-CP	200	---
4-CP	200	---
PCP	800	200

#### 2.1.2.2 CONSORTIUM B

Le consortium B a été isolé à partir d'un mélange de sols d'une usine de préservation de bois, de sols contaminés au PCP, de déchet liquide du chemostat A et de boues activées ayant servi au traitement du phénol.

Ce mélange a été mis en suspension dans un milieu de sels

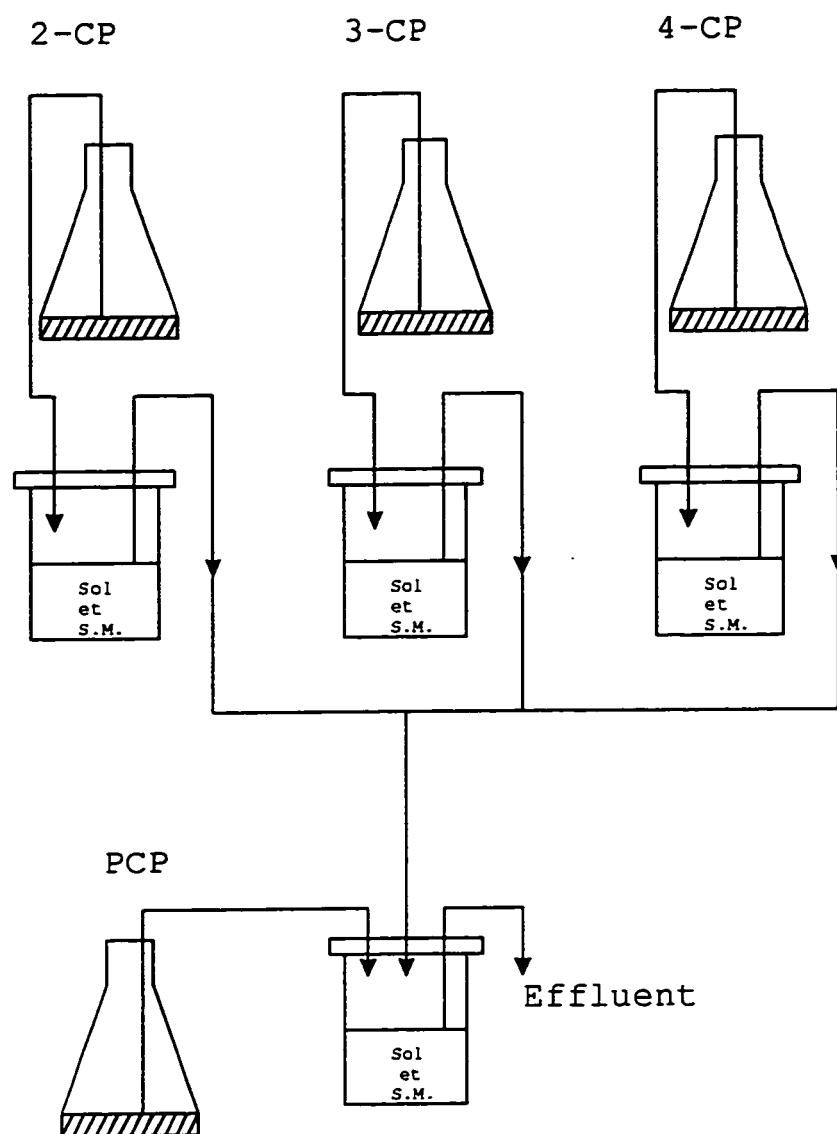


Figure 2.1 : Adaptation du consortium A

minéraux qui était alimenté de PCP seulement. Au départ, la concentration d'alimentation était de 400 ppm. Cependant, elle a été réduite à 200 ppm étant donné l'instabilité des microorganismes par rapport à la dégradation du PCP dans le chemostat. Tout comme décrit précédemment, le chemostat B était aussi muni d'un barreau magnétique et d'un apport d'air.

## **2.2 MÉTHODES ANALYTIQUES**

### **2.2.1 PCP**

La disparition du PCP a été mesurée par deux techniques différentes, soit en mesurant la concentration résiduelle dans le milieu aqueux ou en évaluant la concentration en  $\text{CO}_2$  produit par la minéralisation du PCP.

La concentration en PCP en milieu aqueux a été évaluée à l'aide d'une méthode colorimétrique et par chromatographie. La première méthode consistait à mesurer l'absorbance à 319 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, soit le Milton Roy Spectronic 1001 Plus. Un volume quelconque de NaOH 0.1 M était ajouté à l'échantillon à mesurer dans le but d'augmenter le pH de la solution et rendre tout le PCP sous sa forme ionique, soit l'ion phénolate. L'ajout de NaOH permettait



également de diluer l'échantillon lorsqu'il était nécessaire. Une centrifugation du mélange échantillon/NaOH est important lorsque la concentration en biomasse est élevée.

L'identification et la quantification du PCP et de certains métabolites produits lors d'une expérience de dégradation est possible à l'aide d'un CG\SM. L'appareil utilisé était un Varian Saturn II, 3400. L'échantillon à mesurer était soumis à diverses extractions liquide/liquide et à une évaporation avant son passage au CG\SM. La technique d'extraction utilisée est celle proposée par le MENVIQ (1990). La liste des métabolites recherchés est décrite au tableau 2.3.

Afin de déterminer si le PCP est minéralisé, une mesure à l'aide de  $^{14}\text{C}$ -PCP a été utilisée. L'évolution du  $^{14}\text{CO}_2$  produit dans le temps a été quantifié selon la technique décrite par Sharabi et Bartha (1993).

#### **2.2.2 Glucose**

L'analyse du glucose a été effectuée par la méthode colorimétrique DNS. Lors de ce test, l'absorbance du mélange échantillon/réactifs a été mesurée à 600 nm à l'aide du spectrophotomètre, Milton Roy Spectronic 1001 Plus.

Tableau 2.3 : Liste des métabolites recherchés par l'analyse  
au CG/SM

Métabolites
s2-Fluorophénol
sPhénol-D5
Phénol
2-Méthylphénol
3-Méthylphénol
s2-Chlorophénol-d4
2-Chlorophénol
2,4-Diméthylphénol
2,4-Dichlorophénol
2,6-Dichlorophénol
4-Chloro-3-Méthylphénol
2,3,5-Trichlorophénol
4-Nitrophénol
2,4,6-Trichlorophénol
2,4,5-Trichlorophénol
2,3,4-Trichlorophénol
2,3,5,6-Tétrachlorophénol
2,3,4,5-Tétrachlorophénol
s2,4,6-Tribromophénol

### 2.2.3 Biomasse

Un consortium est composé de microorganismes qui dégradent le PCP et d'autres qui le tolèrent sans toutefois l'utiliser comme source de carbone. Il est donc possible de mesurer la concentration totale en biomasse, soit tous les microorganismes présents dans le milieu de culture, ou seulement les cellules spécifiques à la dégradation du PCP.

Trois méthodes différentes ont permis de suivre l'évolution de la concentration totale des microorganismes. Lorsque du glucose était ajouté au milieu de culture, la croissance microbienne était suivie par la densité optique à 600 nm. Cette méthode n'a pu être utilisée lorsque le PCP était la seule source de carbone car la concentration cellulaire n'était pas suffisante dans ce cas pour constater une augmentation de la densité optique. Lorsqu'une évaluation de la concentration cellulaire était nécessaire, la méthode du nombre le plus probable (NPP) était utilisée. Les échantillons étaient dilués dans une solution saline (9 g/L) puis inoculés dans cinq tubes à NPP. Le milieu de ces tubes était constitué de 5 g/L de tryptone, 2.5 g/L d'extrait de levure et 1 g/L de glucose. Les tubes à dilution ainsi que les tubes à NPP inoculés étaient stérilisés préalablement.

Lors d'un essai seulement, la biomasse totale a été estimée par une mesure de la matière en suspension (MES) et de la matière volatile en suspension (MVES). La méthode consiste à filtrer un certain volume de l'échantillon étudié. Le filtre est premièrement placé à l'étuve pour 24 heures et la différence de poids du filtre du début à cette période, divisée par le volume filtré, représente la valeur de MES. La biomasse est par la suite brûlée en plaçant le filtre dans un four à 550 °C pour 15 min. La différence de poids du filtre après son passage à l'étuve et au four, divisée par le volume filtré, représente la valeur de MVES.

La mesure des microorganismes spécifiques à la dégradation du PCP a également été effectuée par la méthode du nombre le plus probable. Les échantillons étaient dilués dans une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.68 g/L) et de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1.73 g/L) puis inoculés dans trois tubes contenant 1 mL de KOH (1 M) et environ 10 000 DPM de  $^{14}\text{C}$ -PCP. Lorsque la quantité de DPM était deux fois plus élevée que celle du contrôle, le tube était considéré positif.

### **2.3 EXPÉRIENCES DE DÉGRADATION DU PCP**

Les expériences en cuvée et en cuvée alimentée ont été effectuées en flacon agités de 500 mL à la température ambiante et à 180 rpm dans un milieu aqueux de sels minéraux

de 100 mL. Peu importe la stratégie d'inoculation utilisée, l'inoculum transféré au flacon test était de 10 % volumique. Chaque fiole expérimentale était recouverte de papier aluminium afin d'éviter l'élimination du PCP par photodégradation. De plus, dès le début de l'étude, des flacons témoins, sans présence de biomasse, ont montré que le PCP n'était pas volatilisé. Pour éliminer toutes interactions avec des bactéries autres que celles retrouvées dans le chemostat, les expériences se déroulaient de façon stérile.

## **CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### **3.1 CHOIX D'UNE CULTURE MICROBIENNE POUR DÉGRADER LE PCP**

Des cultures axéniques et mixtes ont été étudiées afin de déterminer lequel ou lesquels démontreraient une meilleure performance vis à vis la dégradation du PCP.

Six souches pures ont été obtenues de collection et, à partir de sources contaminées aux chlorophénols, deux consortiums ou cultures mixtes ont été enrichis en utilisant le PCP comme seule source de carbone. Les critères de comparaison entre les diverses sources microbiennes se basent principalement sur les concentrations toxiques à la croissance cellulaire et à la dégradation de PCP.

#### **3.1.1 Souches pures**

Les six souches pures étudiées, soit *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus* PCP-1, CG-1 et CP-2 et *Pseudomonas cepacia*, ont été choisies pour leur capacité à dégrader le PCP (voir chapitre 1, tableau 1.1). Initialement, ces bactéries étaient maintenues sur des milieux nutritifs complets tel le bouillon de culture (nutrient broth) et l'extrait de levure et comme source de carbone, le glucose. Il a été nécessaire

d'adapter ces microorganismes à des milieux moins complexes avant de passer à des tests de dégradation du PCP. L'adaptation s'est effectuée en diminuant graduellement la concentration des éléments nutritifs ci-haut mentionnés jusqu'au remplacement de ceux-ci par des sels minéraux. L'ajout de PCP comme deuxième source de carbone, car le glucose était toujours présent comme source de carbone facilement assimilable, était essentiel puisqu'au départ, les milieux étaient exempts de PCP.

Les séquences d'adaptation des diverses souches étudiées sont détaillées en annexe 1 et résumées au paragraphe suivant.

Aucune croissance n'a été observée lorsque la souche d'*Arthrobacter*, initialement sur un milieu de 8 g/L de bouillon de culture et de 5 g/L d'extrait de levure, a été transférée à un milieu liquide et solide de 4 g/L de bouillon de culture et de 4 g/L d'extrait de levure, avec et sans la présence de 50 ppm de PCP. La souche *Flavobacterium* a crû dans un milieu liquide et solide de 50 ppm de PCP, de 4 g/L d'extrait de levure et de 4 g/L de glucose. Cependant, lors d'un transfert à un milieu identique, aucune croissance n'a été observée. Pour les souches *Rhodococcus*, PCP-I a été perdue après deux transferts à un milieu solide dont la concentration en extrait de levure et en glucose était de 4

g/L, la souche CP-2 n'a pu croître en présence de PCP tandis que la souche CG-I n'a cru que légèrement lorsque le milieu contenait que 10 ppm de PCP. Pour ces trois dernières souches, le milieu initial contenait 4 g/L d'extrait de levure et de glucose.

Par contre, l'adaptation graduelle des cellules lyophilisées de *Pseudomonas cepacia* a permis d'obtenir une croissance satisfaisante de la souche sur un milieu solide contenant des sels minéraux, 1 g/L de glucose et différentes concentrations en PCP. La concentration maximale en PCP ajoutée aux pétris a été de 500 ppm. En absence d'une source de carbone facilement assimilable, soit le glucose, aucune croissance n'était observée sur les différents pétris, peu importe la concentration en PCP présente dans le milieu.

Un test de dégradation du PCP par cette bactérie a tout de même été entrepris en flacon. Un pétri dont le milieu était constitué de sels minéraux, de 1 g/L de glucose et de 50 ppm de PCP a servi à inoculer le milieu aqueux. Ce milieu contenait également des sels minéraux, 1 g/L de glucose et environ 70 ppm de PCP. Le suivi des deux sources de carbone est représenté à la figure 3.1. Le glucose, la source de carbone facilement dégradable, a été consommé totalement en un peu moins de 50 heures. Cependant, la concentration en PCP



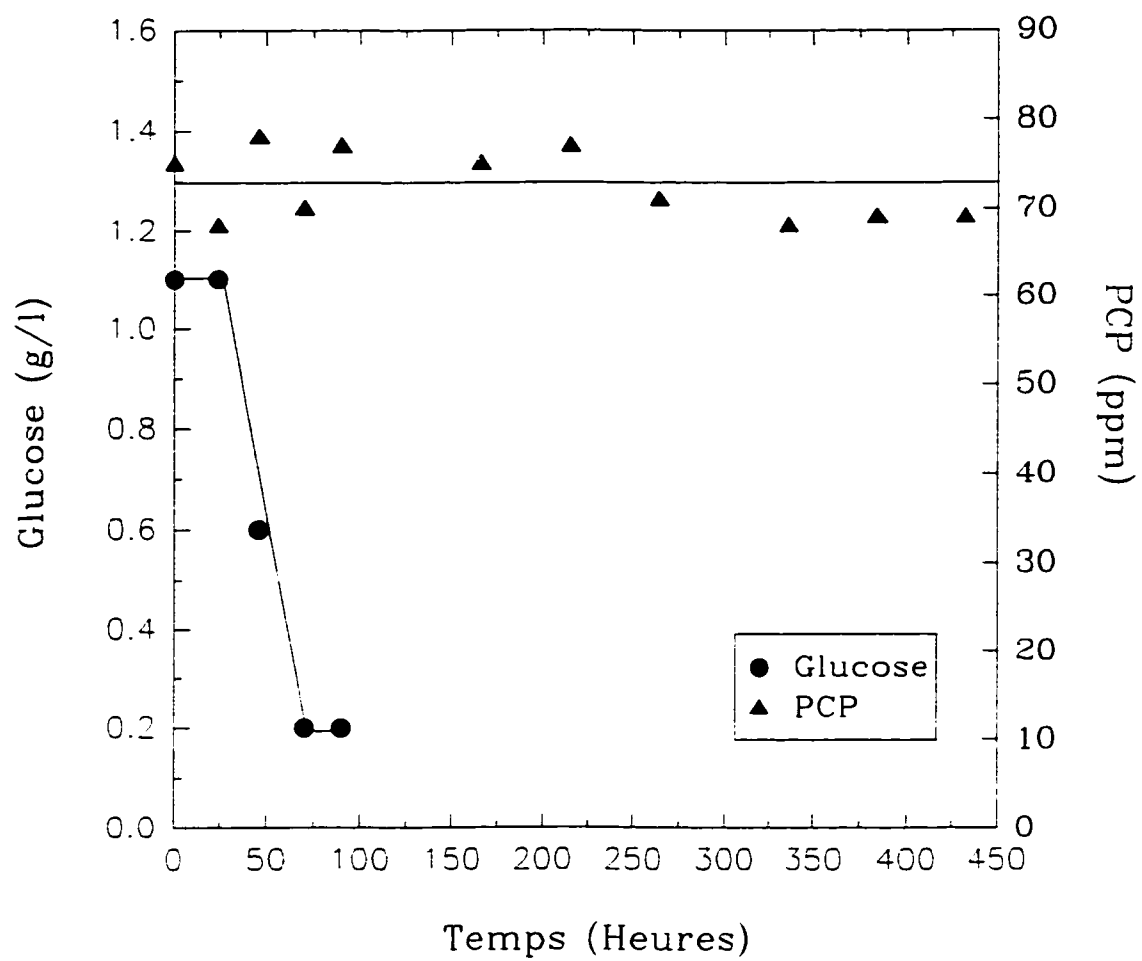


Figure 3.1 : Dégradation en flacon du glucose et du PCP par *Pseudomonas cepacia*

est demeurée inchangée durant les 18 jours d'expérimentation. L'ensemencement au jour 9 d'un pétri contenant un milieu de croissance similaire à celui du flacon expérimental indiquait que la souche *P. cepacia* était toujours vivante et ce, même si le glucose avait été tout consommé depuis environ une semaine. Puisque durant cette période le PCP n'a pas été dégradé, il est probable que les microorganismes ont pourvu à leur maintenance à l'aide de carbone emmagasiné sous forme de réserve. La raison pour laquelle les cellules ne dégradent pas le PCP n'est donc pas causée par une mortalité de celles-ci mais bien parce qu'elles peuvent tolérer le PCP sans toutefois l'utiliser comme source de carbone. Ceci expliquerait pourquoi, sur pétri, *P. cepacia* ne pouvait croître qu'en présence de glucose dans le milieu de culture.

Il semble donc, qu'au niveau des six souches pures étudiées, seulement *P. cepacia* peut tolérer de hautes concentrations en PCP. Cependant, ce composé ne peut être dégradé par cette bactérie.

L'avantage à travailler avec des souches pures dont les gènes responsables pour la dégradation du PCP sont stables est lorsque l'on ajoute une source de carbone facilement assimilable comme co-substrat au PCP. En ajoutant ce co-substrat, la population microbienne augmente en nombre sans

toutefois changer. Les taux de dégradation sont alors plus élevés. Par contre, un désavantage non négligeable est la compétition possible entre la souche pure et d'autres microorganismes retrouvés naturellement dans des eaux ou des sols contaminés au PCP. Il est donc essentiel d'étudier des cultures mixtes qui pourront tolérer des concentrations élevées en PCP et les dégrader également, sans retrouver cet effet de compétition puisqu'elles proviennent de sources contaminées en PCP.

### **3.1.2 Consortiums**

Le développement et l'adaptation des consortiums A et B ont permis de maintenir ceux-ci en chemostat à l'aide d'un apport continu en PCP comme seule source de carbone. Un chemostat est en fait un réacteur en continu parfaitement mélangé (souvent appelé CSTR) qui est utilisé pour cultiver des cellules. Le mélange est effectué par bullage, par agitation mécanique ou par les deux. Le mélange est assez important pour considérer que la concentration est uniforme dans tout le réacteur. La concentration de l'effluent est donc égale à la concentration à l'intérieur du réacteur.

Il est bon de rappeler que la flore bactérienne du consortium A provient d'un sol contaminé d'une usine de préservation du

bois et qu'une adaptation aux trois différents isomères de mono-chlorophénols puis au PCP a été effectuée. Le consortium B a été isolé à partir d'un mélange de sols d'une usine de préservation du bois, de sols contaminés au PCP, de déchet liquide du chemostat A et de boues activées d'un traitement de phénol. Ce chemostat n'était alimenté qu'en PCP seulement avec une concentration de 200 ppm. La concentration d'alimentation en PCP au chemostat A était de 800 ppm.

Les microorganismes formant ces deux consortiums, soit environ  $10^7$  cellules/mL, peuvent dégrader le PCP puisque la concentration résiduelle mesurée à la sortie des réacteurs était en deça de 20 ppm. Reste à savoir maintenant pour les deux consortiums, à quelle concentration le PCP devient toxique à la croissance cellulaire et à sa propre dégradation. Ces deux tests de toxicité ont été réalisés en flacon.

#### 3.1.2.1 EFFET DE LA CONCENTRATION INITIALE EN PCP SUR LA CROISSANCE MICROBIENNE

Une méthode souvent utilisée pour évaluer la toxicité d'un produit spécifique sur des microorganismes est d'ajouter différentes concentrations de ce composé dans un milieu favorable à la croissance microbienne (Ramsay et al., 1986). Tous les flacons sont comparés à un flacon témoin ne contenant

pas le produit testé, soit, dans ce cas-ci, seuls des sels minéraux et du glucose, et pas de PCP. La concentration en PCP dans les flacons tests dont la concentration cellulaire est inférieure à celle mesurée dans le flacon témoin est considérée comme étant inhibitrice. Lorsqu'aucune croissance cellulaire n'est observée, la concentration en PCP est considérée comme toxique. Lors de ce test, la concentration en biomasse était mesurée à l'aide de la densité optique à 600 nm et par des mesures en masses sèches, soit les matières en suspension (MES) et les matières volatiles en suspension (MVES). Les fioles expérimentales étaient inoculées directement avec un volume quelconque du chemostat testé.

#### 3.1.2.1.1 Consortium A

Le test de toxicité sur la biomasse a montré qu'en présence de 50 ppm de PCP et plus, la croissance des microorganismes du consortium A était inhibée, c'est-à-dire qu'une diminution de la densité optique à 600 nm et des masses sèches était observée (voir le tableau 3.1). Par contre, la concentration à laquelle le PCP devient toxique à la croissance microbienne n'a pu être déterminée. En effet, même en présence de 1000 ppm de PCP, une certaine croissance est notée à l'aide des masses sèches, avec des valeurs de 85 et de 63 mg/L en MES et MVES respectivement. La concentration en biomasse mesurée par

Tableau 3.1 : Effet de la concentration initiale en PCP sur la croissance microbienne du consortium A

PCP (ppm)	t = 0 h		t = 24 h			
	pH	A600	pH	A600	MES (mg/L)	MVES
0	7.09	0.038	6.61	2.10	172	131
10	7.07	0.040	6.63	1.97	181	155
50	7.07	0.047	6.59	1.90	54	35
100	7.09	0.068	6.59	1.71	71	59
500	7.09	0.240	6.82	1.75	ND	ND
1000	7.09	0.463	6.65	2.02	85	63

ND : Non déterminé

la densité optique à 600 nm ne peut être considérée à de hautes concentrations en PCP puisqu'une certaine coloration rosée du milieu interfère lors de la mesure. Cette coloration n'est pas due à une précipitation du PCP puisqu'au départ, tout le PCP était soluble et que le pH, quoiqu'un peu plus faible, est similaire à ceux mesurés dans les autres fioles ne montrant aucune coloration. D'ailleurs, la baisse du pH après

24 heures d'incubation démontre qu'une partie du glucose a été consommé et que les microorganismes qui ont cru peuvent tout au moins tolérer 1000 ppm de PCP. Si les microorganismes n'avaient pas toléré la concentration en PCP présente dans le flacon, le pH du milieu aurait été inchangé indiquant ainsi que le glucose n'a pas été assimilé par les cellules. Cette concentration aurait été toxique à la croissance des microorganismes.

#### 3.1.2.1.2 Consortium B

Pour le consortium B, la mesure des masses sèches montre une inhibition croissante des microorganismes avec la concentration en PCP. En effet, comme l'indique le tableau 3.2, la valeur des MES et surtout des MVES diminue graduellement à partir de 10 ppm de PCP avec une chute plus marquée à 250 ppm. En ce qui a trait à la toxicité de ce même produit vis à vis la croissance de la biomasse, la mesure des masses sèches indique que le PCP peut être toléré par les cellules jusqu'à la concentration étudiée, soit 500 ppm. La concentration à laquelle le PCP devient totalement toxique pour la croissance des microorganismes se situent au-delà de 500 ppm.

Tableau 3.2 : Effet de la concentration initiale en PCP sur la croissance microbienne du consortium B

PCP (ppm)	t = 0 h		t = 24 h			
	pH	A600	pH	A600	MES (mg/L)	MVES
0	7.10	0.217	6.98	2.03	204	101
10	7.10	0.222	7.05	1.98	193	85
25	7.10	0.229	7.05	1.95	162	78
50	7.10	0.245	7.05	1.93	146	68
75	7.10	0.249	7.02	1.89	116	51
100	7.10	0.265	7.05	1.97	148	64
250	7.12	0.392	6.95	2.00	38	28
500	7.12	0.500	6.95	2.40	28	18

### 3.1.2.2 EFFET DE LA CONCENTRATION INITIALE EN PCP SUR SA DÉGRADATION

Un test de dégradation en flacon a été réalisé pour les deux consortiums développés. Chaque flacon contenant un milieu aqueux de sels minéraux et, comme seule source de carbone, des concentrations en PCP variant de 0 à 800 ppm. Un certain volume du consortium étudié était transféré directement dans



chaque fiole.

#### 3.1.2.2.1 Consortium A

Le consortium A peut dégrader en cuvée des concentrations initiales en PCP allant jusqu'à 800 ppm (cette dernière concentration non montrée à la figure 3.2 (A) a été dégradé en 400 heures). Des concentrations plus élevées en PCP n'ont pas été étudiées puisqu'il est peu probable qu'une eau soit contaminée à plus de 800 ppm. Des tests réalisés par un autre membre de l'équipe ont montré que l'eau de lavage de sols contaminés à 500 ppm de PCP n'était concentrée qu'à 3 ppm. Même si tout le PCP était désorbé, la concentration retrouvée dans l'eau serait inférieure à la concentration maximale étudiée. De plus, un problème de solubilité du composé organique peut survenir à de très hautes concentrations.

La concentration à laquelle le PCP devient toxique à sa propre dégradation, c'est-à-dire qu'aucune dégradation ne se produit, se situe au-delà de 800 ppm. À des concentrations inférieures, le PCP comme seule source de carbone est dégradé après une latence par les microorganismes du consortium A.

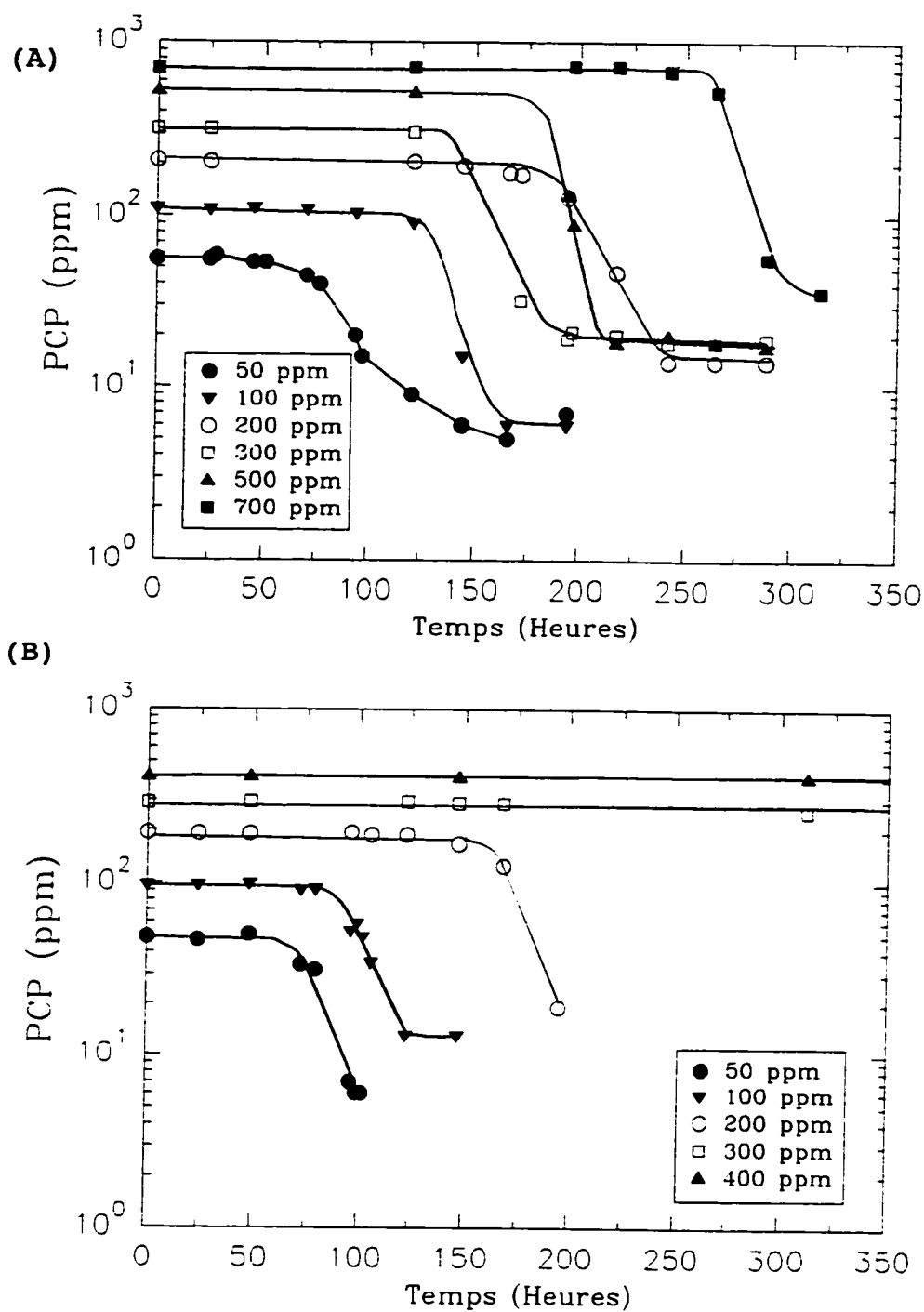


Figure 3.2 : Effet de la concentration initiale en PCP sur sa dégradation par le consortium A (A) et B (B)

#### 3.1.2.2.2 Consortium B

Les microorganismes du consortium B peuvent dégrader, après une latence, le PCP comme seule source de carbone jusqu'à une concentration initiale de 200 ppm (voir figure 3.2 (B)). À des concentrations plus élevées, le PCP n'est pas consommé indiquant qu'une concentration d'environ 300 ppm est toxique à la dégradation du composé étudié.

#### 3.1.2.3 COMPARAISON DES CONSORTIUMS

Le tableau 3.3 résume les résultats obtenus lors des tests de toxicité sur la croissance des microorganismes et sur la dégradation du PCP pour les deux consortiums développés.

Pour les deux consortiums, les concentrations auxquelles le PCP inhibe ou empêche la croissance cellulaire se ressemblent (inhibition à 50 ppm pour le consortium A et début d'inhibition à 10 ppm pour le consortium B). Étant donné qu'un certain volume du chemostat A a servi à inoculer le chemostat B, des résultats similaires étaient attendus. Par contre, au niveau du test de dégradation du PCP, les microorganismes du consortium A ont dégradé des concentrations beaucoup plus élevées du polluant organique comparativement au consortium B. Ce résultat s'explique en partie par les

concentrations d'alimentation à chacun des chemostats. Le consortium B était alimenté continuellement de 200 ppm de PCP tandis que l'alimentation du chemostat A était de 800 ppm. En augmentant la concentration d'alimentation du consortium B, la concentration toxique à la dégradation augmenterait probablement. Par contre, ceci n'a pu être effectué à cause de l'instabilité de la dégradation du PCP par les microorganismes de ce consortium lorsque le réacteur était alimenté à des concentrations supérieures à 200 ppm. D'autre part, l'adaptation individuellement aux trois différents isomères de monochlorophénol contribue sûrement à la dégradation de concentrations plus élevées en PCP par le consortium A.

Tableau 3.3 : Comparaison des consortiums

Consortium	Croissance microbienne		Dégradation PCP
	$C_{inh}^1$ (ppm)	$C_{tox}^2$ (ppm)	$C_{tox}$ (ppm)
A	50	>1000	>800
B	10	>500	300

1.  $C_{inh}$  est la concentration en PCP inhibitrice à la croissance microbienne;

2.  $C_{tox}$  est la concentration en PCP toxique à la croissance microbienne ou à la dégradation du PCP.

Selon ces résultats, il semble que les microorganismes du consortium A sont ceux qui démontrent une meilleure performance au niveau de la dégradation du PCP. Une étude plus approfondie sur le comportement de ce consortium fera l'objet des sections suivantes.

### 3.2 MINÉRALISATION DU PCP

Il est important de vérifier, dès le début, si le PCP lors des tests de dégradation est minéralisé ou seulement dégradé en des molécules plus simples. Pour ce faire, trois méthodes analytiques différentes ont été utilisées et comparées.

La mesure au spectrophotomètre à 319 nm quantifie la concentration résiduelle en PCP dans le milieu aqueux. Cette méthode a été celle la plus souvent utilisée car elle est simple et elle permet d'obtenir un résultat en très peu de temps. Afin de justifier ces résultats, une comparaison a été réalisée à l'aide d'un CG/SM. Le CG/SM permet de mesurer la concentration en PCP et de certains métabolites susceptibles d'être produits lors de la dégradation. La liste des composés vérifiés par cette méthode se retrouve au tableau 2.3.

Lors d'un essai de dégradation, les concentrations initiales et finales en PCP ont été comparées à l'aide de ces deux

méthodes (voir tableau 3.4). Ces résultats indiquent qu'au départ, les concentrations mesurées au spectrophotomètre concordent avec celles du CG/SM mais que les concentrations finales diffèrent. Cette différence s'explique par une coloration du milieu de culture avec le temps qui interfère avec la mesure au spectrophotomètre. Les valeurs obtenues à l'aide du CG/SM montrent donc que le PCP est totalement dégradé puisque les concentrations finales sont inférieures à 0.5 ppm. De plus, il semble que ce dernier soit même minéralisé car les concentrations de tous les métabolites étudiés sont en-deçà de 0.1 ppm.

Tableau 3.4 : Comparaison de mesures de PCP au spectrophotomètre (à 319 nm) et au CG/SM

A <sub>319</sub>		CG/SM	
C <sub>initiale</sub> (ppm)	C <sub>finale</sub> (ppm)	C <sub>initiale</sub> (ppm)	C <sub>finale</sub> (ppm)
54	3	49	0.3
206	16	211	0.4
527	24	530	0.5

Afin de vérifier la minéralisation du PCP, des tests à l'aide de PCP marqué (<sup>14</sup>C-PCP) ont été réalisés dans des flacons

biométriques. La concentration en  $^{14}\text{CO}_2$  produit dans le temps permettait de calculer le pourcentage de  $^{14}\text{C}$ -PCP minéralisé. Un exemple est reproduit à la figure 3.3. Ces résultats montrent qu'environ 70 % du  $^{14}\text{C}$ -PCP se retrouve sous forme de  $^{14}\text{CO}_2$  en fin d'expérimentation. De plus, un test a montré que seulement 5 % du  $^{14}\text{C}$ -PCP se retrouvait encore dans le surnageant. L'autre 25 % peut avoir été incorporé à la biomasse ou avoir fuit du flacon biométrique. Le pourcentage de minéralisation calculé est toutefois similaire à ceux reportés par la littérature (Kirsch et Etzel, 1973; Lin et Wang, 1991).

Selon les trois méthodes utilisées, il semble que le PCP est bien minéralisé et que la concentration résiduelle en PCP est pratiquement nulle. La concentration finale mesurée au spectrophotomètre, est tout simplement due à une coloration du milieu du culture.

### 3.3 STRATÉGIE D'INOCULATION

L'ensemencement des milieux aqueux lors de tests de dégradation en flacon peut se faire de deux façons. Premièrement, une inoculation directe de la fiole expérimentale peut être effectuée en y transférant un volume quelconque du chemostat étudié. Le PCP est alors la seule

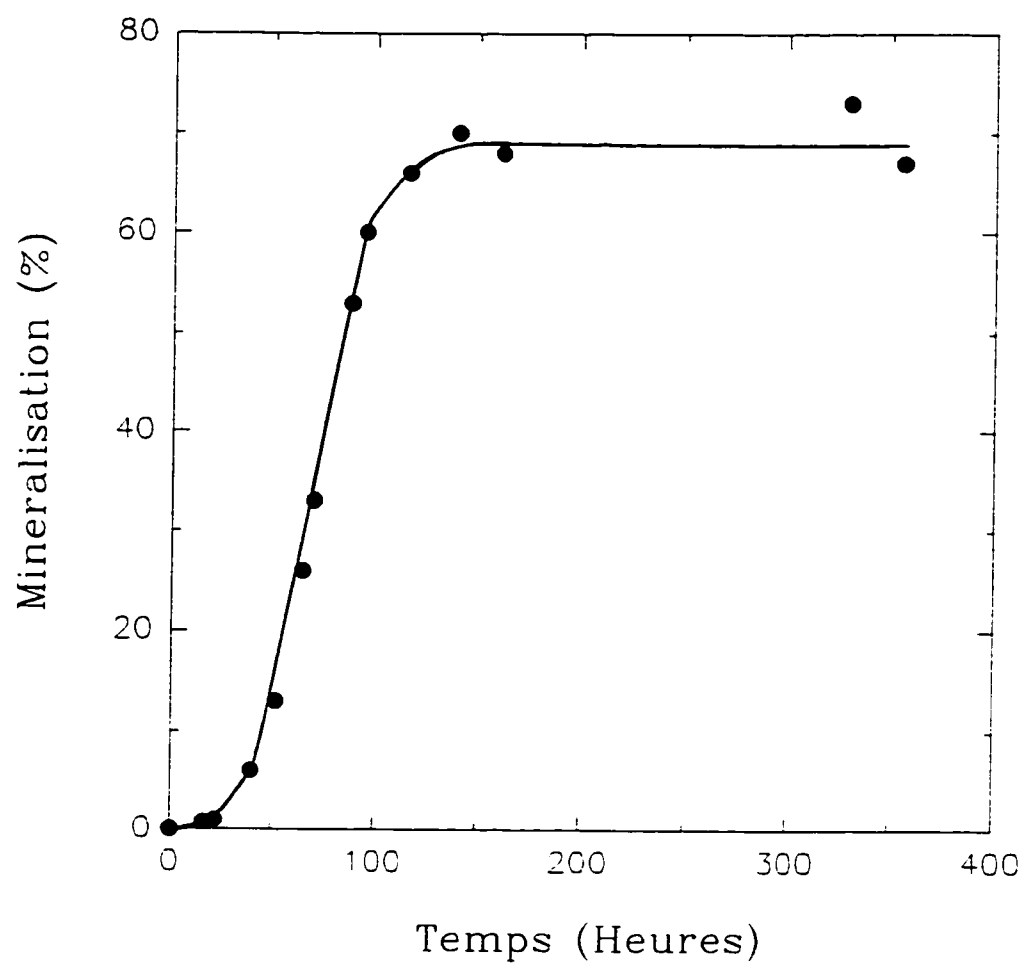


Figure 3.3 : Exemple de minéralisation de 50 ppm de PCP par le consortium A



source de carbone disponible. En deuxième lieu, la concentration cellulaire du chemostat étudié peut être augmentée par l'ajout d'un co-substrat facilement assimilable. Pour ce faire, un volume du chemostat est transféré à une fiole contenant des sels minéraux, 50 ppm de PCP et 1 g/L de co-substrat. Lorsque les deux sources de carbone ont été consommées, un volume de cette fiole sert d'inoculum à la fiole expérimentale ne contenant que du PCP comme source de carbone.

L'ajout d'une source de carbone facilement dégradable peut selon certains auteurs diminuer ou éliminer la phase de latence observée avant la dégradation du PCP (Topp et al., 1988; Gonzalez et al., 1991). De plus, l'ajout d'un co-substrat peut améliorer le taux de dégradation du composé organique toxique (Topp et al., 1988). Afin de vérifier la validité de ces affirmations pour le consortium A, des expériences en cuvée et en cuvée alimentée ont été planifiées. Les critères qui permettront de comparer les deux stratégies de préparation d'inoculum seront la durée de la latence, l'évolution de la biomasse, les taux de dégradation spécifique et non-spécifique du PCP. Cependant, avant de procéder à cette comparaison, il faut tout d'abord déterminer comment l'inoculum avec co-substrat sera préparé.

### 3.3.1 Préparation d'un inoculum avec ajout d'un co-substrat

Avant d'évaluer l'effet d'un co-substrat sur la dégradation du PCP, il faut déterminer quelle sera la source de carbone facilement assimilable et comment l'ajout sera effectué.

Dans un premier temps, différents co-substrats ont été ajoutés à des milieux de sels minéraux et de PCP afin de déterminer lequel conviendrait le mieux à la dégradation du PCP par rapport à la latence et au taux de dégradation observés. Les co-substrats étudiés étaient le glucose, l'acide glutamique, l'acétate de sodium et l'acide succinique. Le choix de ces co-substrats s'est basé sur la littérature (Topp et al., 1988; Gonzalez et al., 1991; Radehaus et Schmidt, 1992). Il a été déterminé par cette étude que le glucose était le co-substrat qui convenait le mieux à la dégradation du PCP. La latence ainsi que le temps mis pour dégrader 40 ppm de PCP étaient plus courts comparativement aux autres co-substrats. Cette expérience a été réalisée par Jean-Louis Bertrand et Ghislain Boucher et les résultats obtenus sont reproduits à l'annexe 2.

Pour déterminer comment l'ajout du glucose sera effectué, trois préparations différentes d'inoculum en présence de glucose ont été comparées aux cellules provenant directement du chemostat A. La figure 3.4 schématise cette expérience.

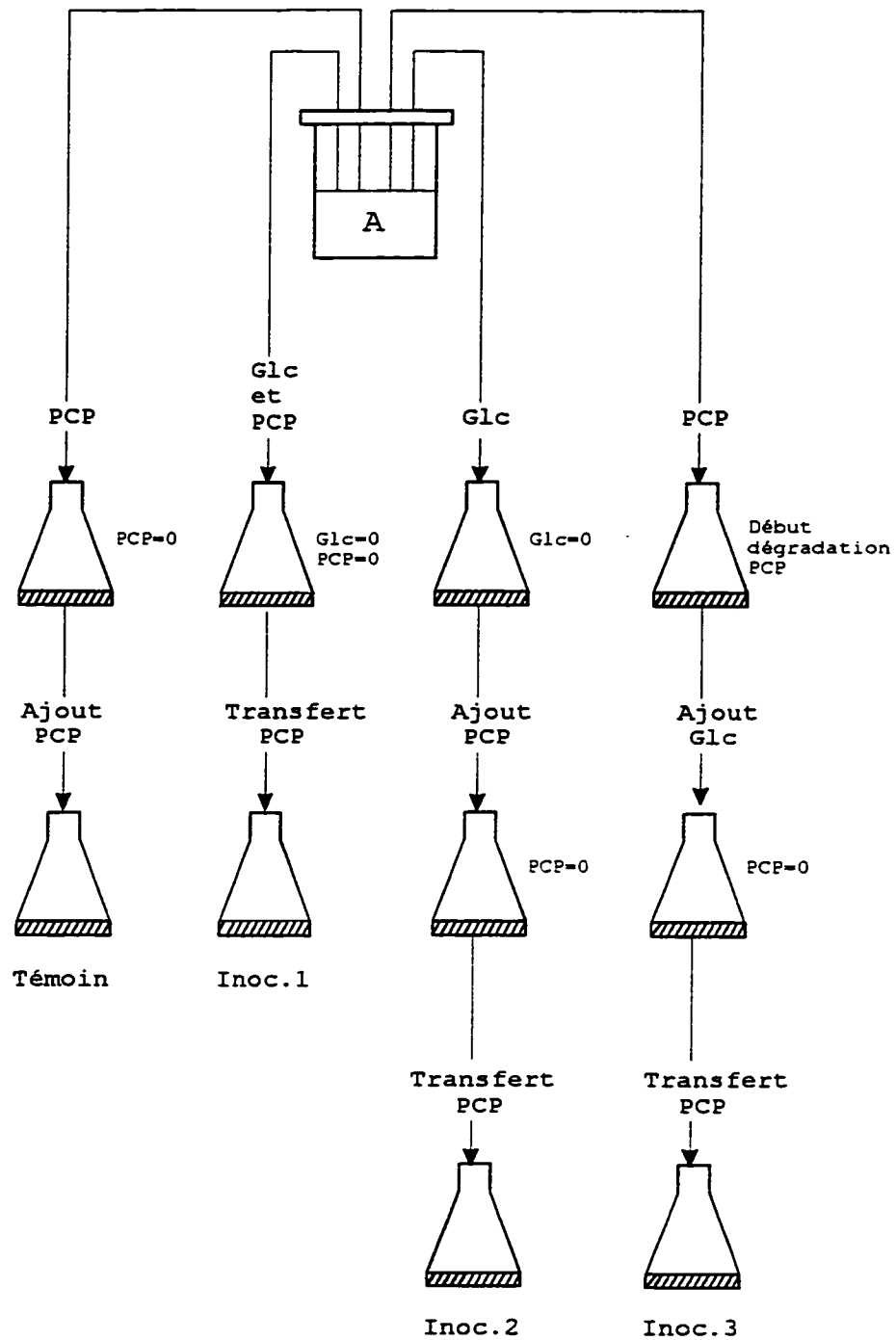


Figure 3.4: Préparation d'inoculums avec glucose

Au départ, un volume du chemostat A, correspondant à 10 % volumique du milieu de culture, était transféré à chacune des préparations d'inoculum. Le milieu du premier inoculum contenait initialement des sels minéraux, du glucose et du PCP. L'inoculum 2 était composé au départ de sels minéraux et de glucose et un ajout de PCP était effectué en fin de croissance logarithmique des cellules. Cette période correspond à la fin de la consommation du glucose par les microorganismes. L'inoculum 3 contenait au début un milieu aqueux de sels minéraux et de PCP et l'ajout du co-substrat se faisait en début de dégradation du PCP. Pour chaque préparation d'inoculum, la concentration en glucose était de 1 g/L et celle du PCP de 50 ppm.

Le suivi de la biomasse, du glucose et du PCP de l'inoculum 1 et 2 est illustré en annexe 3 tandis que celui de l'inoculum 3 est reproduit à la figure 3.5. De cette figure, il est possible de constater que le glucose est consommé préférentiellement au PCP. En effet, lors de l'ajout du glucose (à  $t=78$  h), la dégradation du PCP s'est interrompue et les cellules ont consommé la source de carbone facilement assimilable. Lorsque cette dernière a été épuisée, la dégradation du PCP a repris.

Lorsque tout le PCP des trois inoculums était totalement

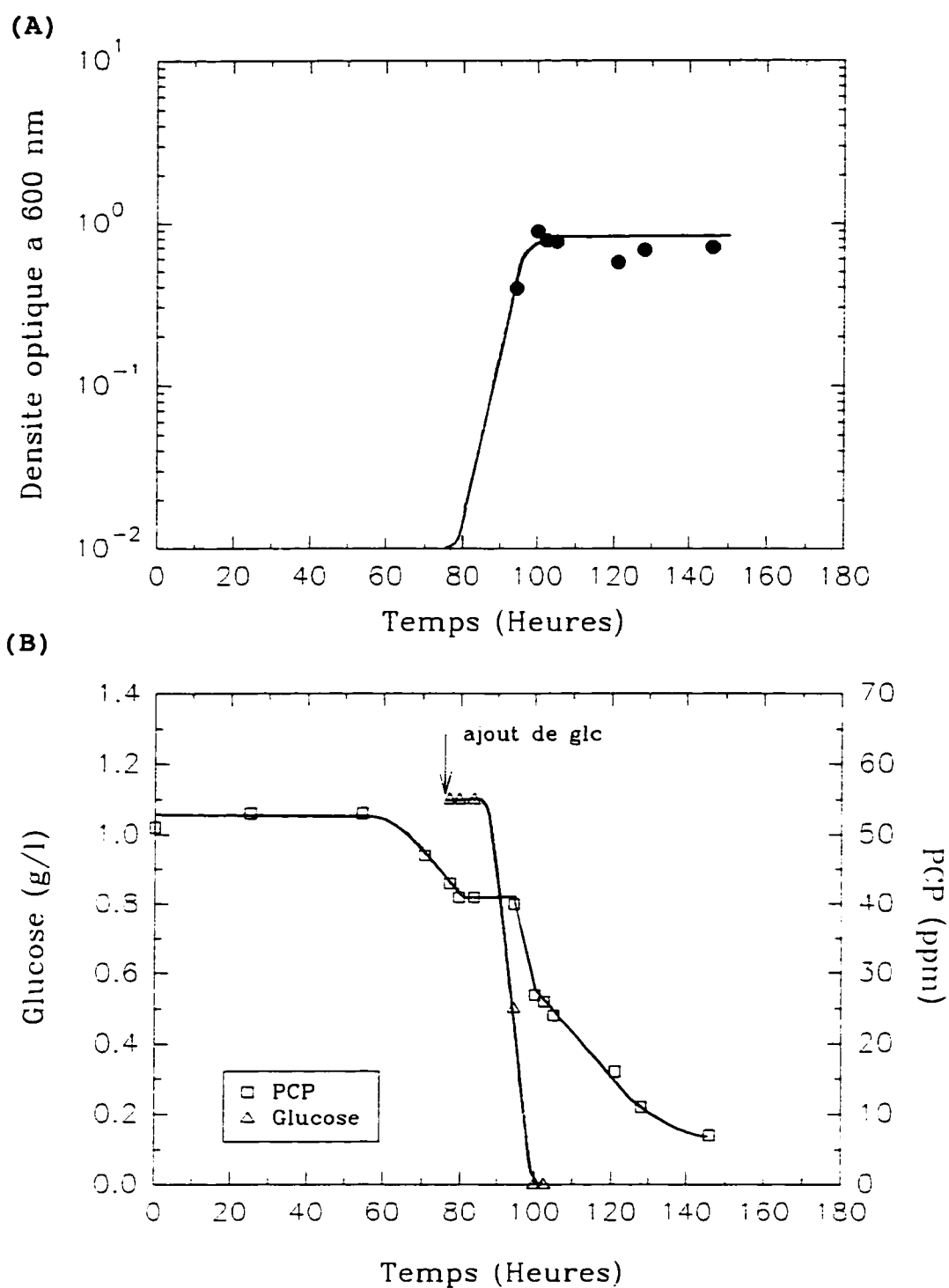


Figure 3.5 : Suivi de la biomasse totale (A) du glucose et du PCP (B) pour l'inoculum 3

dégradé, un volume de chacun des flacons a servi à inoculer des fioles ne contenant que des sels minéraux et 50 ppm de PCP. Le suivi du PCP dans le temps pour chaque inoculum et puis celui de la fiole expérimentale s'y rattachant, est illustré à la figure 3.6. Le segment de la courbe a) représente le suivi du PCP dans un inoculum et le segment de la courbe b), celui dans la fiole expérimentale inoculée ne contenant que du PCP comme seule source de carbone. L'évolution du PCP dans le flacon témoin inoculé directement du chemostat A est également représenté à cette figure.

Pour les trois inoculums, en présence de glucose (soit les segments de la courbe a) une latence bien définie est observée avant la dégradation du PCP. Cette latence est plus importante que lorsque les cellules sont en présence de PCP seulement (voir flacon témoin) car le glucose et le PCP sont consommés séquentiellement. Lorsque l'inoculation de fioles ne contenant que du PCP comme source de carbone est effectuée à l'aide de ces trois inoculums (segments de la courbe b), une faible dégradation est observée tout de suite, suivi d'une dégradation plus rapide. Cette faible dégradation observée au début est probablement une phase d'adaptation des cellules qui sont en moins grand nombre mais qui se retrouvent en présence d'une même concentration en PCP.

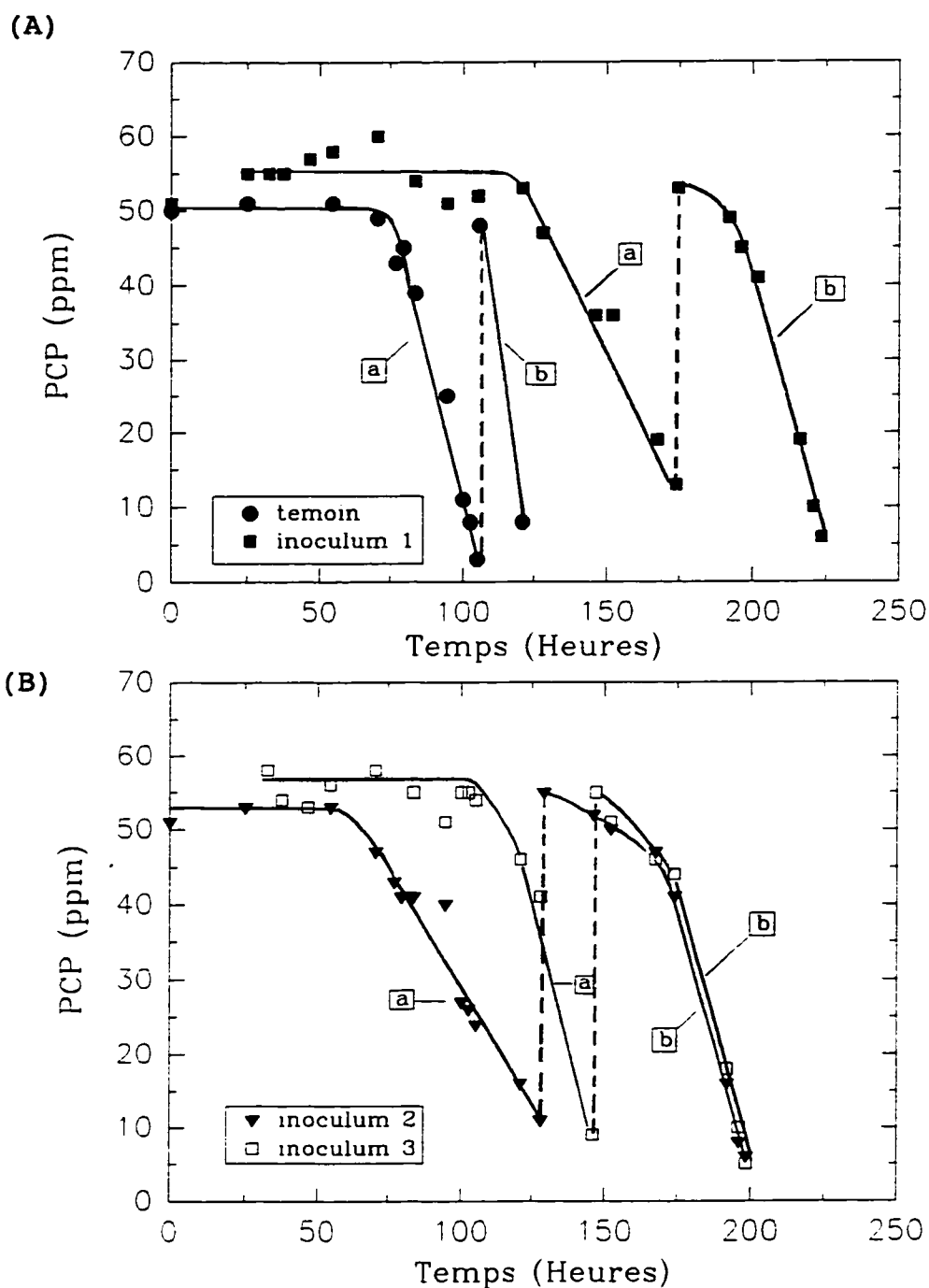


Figure 3.6 : Suivi du PCP pour trois inoculums différents avec glucose ainsi que pour la fiole expérimentale s'y rattachant. Le témoin a été inoculé directement du chemostat A

Afin de déterminer quelle préparation d'inoculum est préférable, des taux de dégradation ont été calculés pour les deux parties de courbe de la figure 3.6. Des mesures de la biomasse spécifique à la dégradation du PCP et de la biomasse totale, soit de tous les microorganismes présents incluant les spécifiques et ceux qui tolèrent le PCP sans toutefois le dégrader, se retrouvent également au tableau 3.5. Rappelons que ces deux concentrations ont été mesurées à l'aide de la méthode du nombre le plus probable (NPP). Pour la concentration totale, un milieu riche de tryptone, d'extrait de levure et de glucose favorisent la croissance de tous les microorganismes présents. Par contre, pour la concentration spécifique, un milieu sélectif contenant du KOH (1.0 M) et du  $^{14}\text{C}$ -PCP, permettait la croissance que des microorganismes pouvant dégrader le PCP.

En présence de glucose, le taux de dégradation du PCP ( $r_u$ ) de l'inoculum 2 est un peu plus élevé que pour les deux autres inoculums. Par contre, en présence de PCP seulement, les taux de dégradation ( $r_b$ ) sont similaires dans les trois cas. En toute fin d'expérience, la concentration cellulaire totale ( $X_{\text{totale}}$ ) et spécifique ( $X_{\text{spécifique}}$ ) ont été mesurées dans chacun des flacons. Le tableau 3.5 indique que la concentration totale en biomasse de l'inoculum 1 est plus faible comparativement aux deux autres flacons, mais que les microorganismes



spécifiques à la dégradation du PCP sont en plus grand nombre.

Tableau 3.5 : Valeurs des  $r_s$ ,  $q_s$ , X totales et spécifiques pour les trois préparations différentes d'inoculum avec co-substrat et un flacon témoin

INOCULUM	$r_s$ (ppm/h)	$q_s$ (mg PCP cellule <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$X_{totale}$ (cellules mL <sup>-1</sup> )	$X_{spéc}$ (cellules mL <sup>-1</sup> )
TÉMOINa) <sup>1</sup>	1.34	$2.1 \times 10^{-11}$	$6.4 \times 10^{10}$	ND <sup>2</sup>
b)	2.58	$4.1 \times 10^{-11}$	$6.3 \times 10^{10}$	ND
1 a)	0.74	ND	ND	ND
b)	1.40	$2.8 \times 10^{-12}$	$4.9 \times 10^{11}$	$1.1 \times 10^7$
2 a)	1.54	ND	ND	ND
b)	1.56	$1.4 \times 10^{-12}$	$1.1 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^5$
3 a)	0.63	ND	ND	ND
b)	1.37	$2.8 \times 10^{-13}$	$4.9 \times 10^{12}$	$3.9 \times 10^5$

1. a) désigne la première partie de courbe de la figure 3.8, soit pour l'inoculum avec glucose et b) la deuxième partie de courbe, soit lors du test de dégradation avec PCP comme seule source de carbone.

2. Non déterminé

Puisque les taux de dégradation du PCP comme seule source de carbone des trois préparations sont similaires ainsi que les temps globaux de dégradation, c'est-à-dire les deux parties de courbe, le choix de la préparation de l'inoculum s'est basé sur la concentration en biomasse spécifique mesurée en fin d'expérience. Pour les prochaines manipulations où une augmentation de la population microbienne sera effectuée en ajoutant un co-substrat, le glucose sera introduit au départ avec le PCP et les sels minéraux comme il a été fait pour l'inoculum 1.

Une observation additionnelle est fournie par la figure 3.6. Lorsqu'un flacon ne contenant que du PCP comme source de carbone est inoculé directement du chemostat (flacon témoin), une latence est notée lors de la première dégradation. Lorsque du PCP est rajouté au même milieu, le composé organique est dégradé rapidement, sans latence. D'ailleurs, le taux spécifique de dégradation du PCP est plus élevé lorsqu'aucun ajout de glucose n'a été effectué au départ.

Des expériences supplémentaires en cuvée puis en cuvée alimentée seront réalisées afin de mieux comprendre les différences entre les deux stratégies d'inoculation.

### **3.4 EXPÉRIENCES EN CUVÉE**

Des expériences en cuvée ont été réalisées afin de mettre en évidence comment s'effectue la dégradation du PCP comme seule source de carbone lorsqu'inoculé directement avec le consortium A. Par la suite, en ajoutant au départ du glucose dans l'inoculum, l'influence de la concentration initiale en biomasse sur la dégradation du PCP a été étudiée.

#### **3.4.1 PCP comme seule source de carbone**

Lors du test sur l'effet de la concentration initiale en PCP sur sa dégradation réalisé pour le consortium A (section 3.1.2.2.1), des concentrations variant de 50 à 800 ppm ont été dégradées par ces microorganismes. Le but de cette expérience n'était pas de bien suivre l'évolution du PCP dans le temps afin de calculer des taux de dégradation, mais bien de déterminer la concentration à laquelle aucune dégradation n'était observée. Une autre expérience utilisant le PCP comme seule source de carbone, donc inoculé directement avec le chemostat A, se doit d'être effectuée en échantillonnant le flacon plus fréquemment afin de bien caractériser l'évolution du PCP dans le temps. De cette façon, il est possible de calculer des taux de dégradation,  $r$ , ainsi que des taux de dégradation spécifique,  $q$ , puisqu'un suivi de la biomasse a

également été effectué. La figure 3.7 illustre l'évolution dans le temps de la concentration en PCP et de la biomasse pour trois concentrations initiales différentes en PCP, soit 50, 200 et 500 ppm.

#### 3.4.1.1 ÉVOLUTION DE LA BIOMASSE

Comme il a été mentionné précédemment, une latence est observée avant la dégradation de la source de carbone. La mesure de la concentration totale en microorganismes, c'est-à-dire les microorganismes qui dégradent spécifiquement le PCP et tous les autres aussi présents, s'est donc effectuées aux trois endroits stratégiques, soit au départ, en fin de latence et en toute fin de dégradation (voir figure 3.7 (B)). Aucune mesure n'a été réalisée durant la latence car en principe, aucune croissance ne devrait se produire puisque la seule source de carbone disponible et nécessaire à la croissance n'est pas consommée. Toutefois, en analysant l'évolution de la biomasse dans le temps pour les trois concentrations en PCP étudiées, il semble que la croissance microbienne s'effectue principalement entre le temps zéro et le début de la dégradation du PCP. En effet, la mesure de la concentration cellulaire était prise lorsque le PCP commençait à être consommé et non juste à la fin de la latence puisqu'il est difficile de déterminer ce moment lors de l'expérimentation.

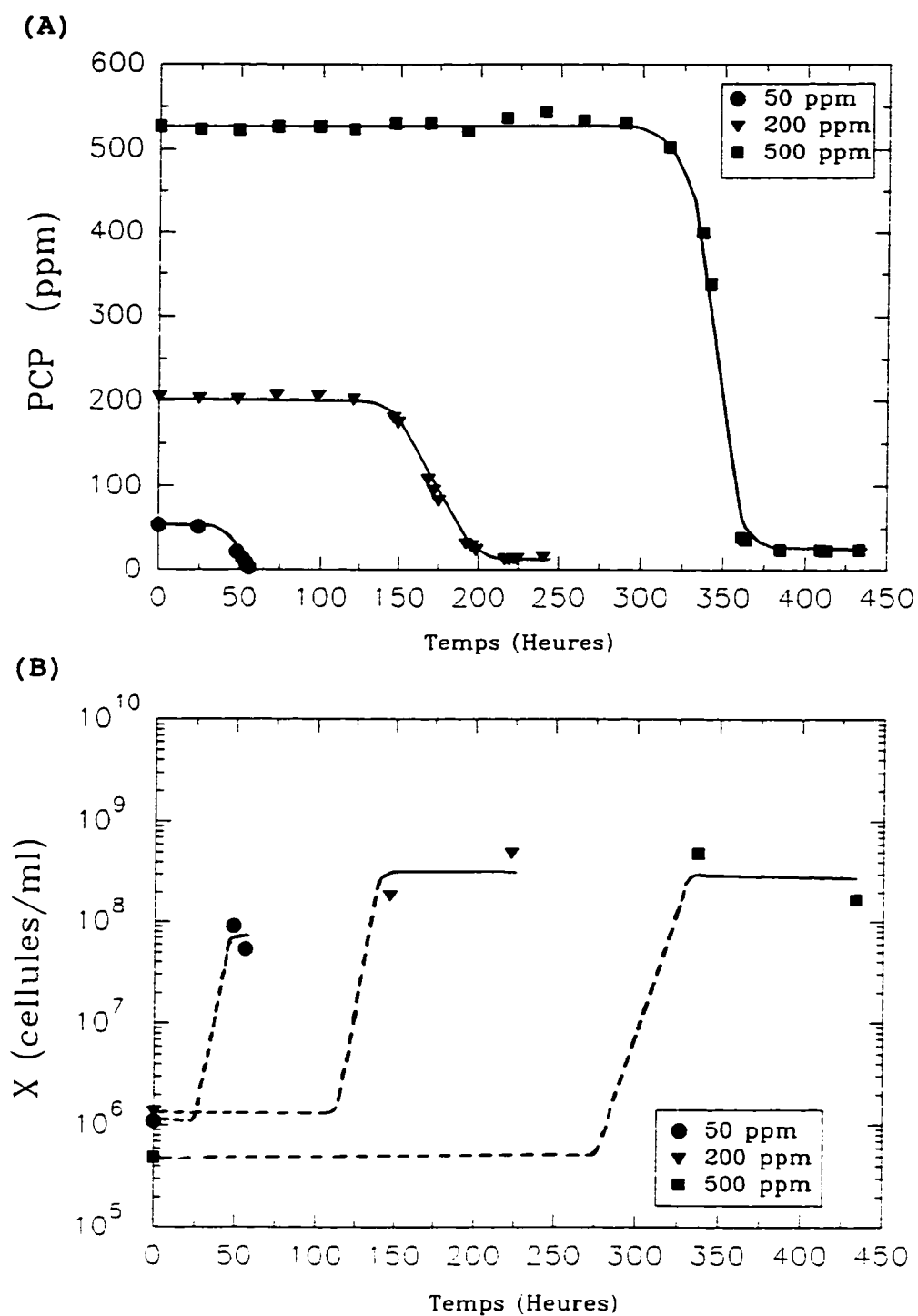


Figure 3.7 : Suivi du PCP (A) et de la biomasse totale (B) lorsqu'inoculé directement du chemostat A

En faisant l'hypothèse que les cellules ne croissent pas lorsqu'elles sont en phase de latence par rapport à la dégradation du PCP, alors la croissance microbienne se produit entre la fin de la latence et le début de la dégradation. Par la suite, aucun changement notable n'est observé. Afin de vérifier cette hypothèse, une autre expérience a été entreprise en effectuant une mesure additionnelle durant la latence. De plus, une mesure des microorganismes spécifiques à la dégradation du PCP a été réalisée en même temps.

Les résultats de ce test à la figure 3.8 ne permettent pas de conclure définitivement sur l'évolution de la biomasse totale durant la latence. D'ailleurs, exceptionnellement lors de cette expérience, la latence via la dégradation des 50 ppm de PCP n'est pas très marquée, c'est-à-dire que les deux points obtenus avant la dégradation proprement dit, soit entre 0 et 45 heures, ne sont pas égaux. Les erreurs de mesure font en sorte qu'il est possible d'interpréter ces données comme étant égales (trait plein) comme il a été observé lors des autres expériences. Cependant, il se peut qu'une légère dégradation se soit produite dès le début (trait discontinu), se traduisant par une hausse graduelle de la concentration totale en microorganismes. Il se peut également que la biomasse totale augmente même si le PCP n'est pas dégradé. La croissance cellulaire s'expliquerait alors par un stockage

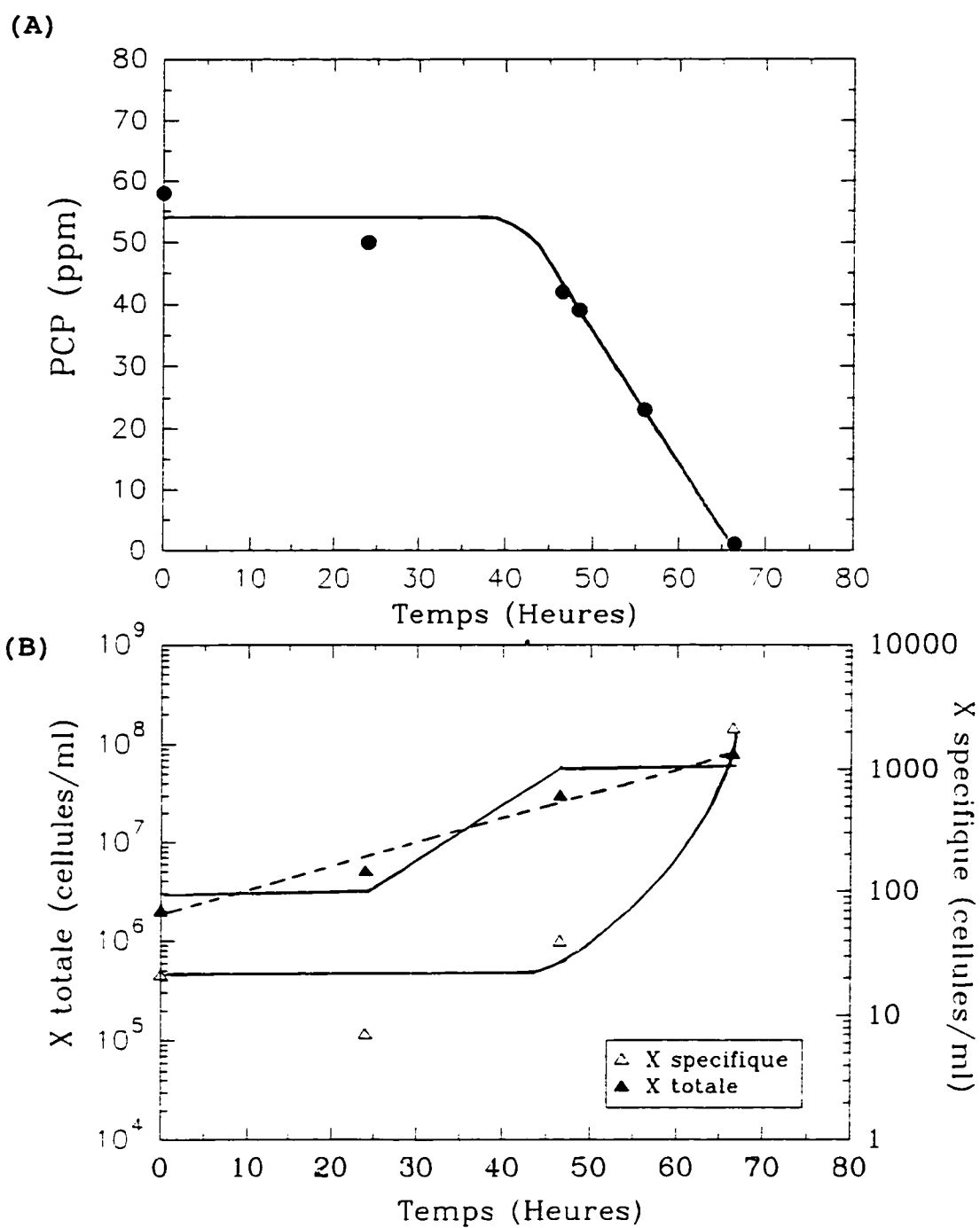


Figure 3.8 : Dégradation du PCP (A), évolution de la biomasse totale et spécifique (B) lorsqu'inoculé directement du chemostat A

d'une substance quelconque, tel le PHB, qui peut être utilisé pour synthétiser des protéines. Cela a déjà été observé chez plusieurs organismes (Henrysson et McCarty, 1993).

Toutefois, l'évolution dans le temps du nombre spécifique de cellules dégradant le PCP indique que celles-ci croissent en majeure partie durant la dégradation du PCP. Cette importante croissance ne se voit pas lors de la mesure totale de la biomasse puisque le nombre spécifique est très faible par rapport au nombre total. Le tableau 3.6 indique le rapport existant entre la biomasse spécifique et totale à différents temps.

Tableau 3.6 : Rapport  $X_{\text{spéc}}/X_{\text{totale}}$  pour la dégradation de 50 ppm de PCP comme seule source de carbone

Temps (heure)	$X_{\text{spéc}}/X_{\text{totale}}$ (%)
0	$1 \times 10^{-4}$
24	$1 \times 10^{-4}$
48	$1 \times 10^{-4}$
68	$3 \times 10^{-3}$



Ce rapport est très faible avec des valeurs se situant entre  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  %. Si l'on considère que la concentration cellulaire totale augmente graduellement alors il faut en déduire que les microorganismes, autres que spécifiques, dégradent les métabolites formés lors de la dégradation du PCP.

Le faible rapport entre les microorganismes spécifiques et totaux indique que le consortium A est constitué principalement de cellules pouvant tolérer le PCP sans toutefois le consommer. En fait, une étude préliminaire a montré que le consortium A était constitué de trois colonies différentes. Il semble, selon les résultats, qu'une seule colonie aurait la capacité de dégrader le PCP. Cependant, après quelques transferts à un milieu de sels minéraux, de PCP, avec ou sans glucose, cette colonie perd sa capacité à dégrader le PCP. Une étude plus poussée à ce sujet est toutefois essentielle pour confirmer ces résultats.

#### 3.4.1.2 ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN PCP

Une phase de latence est observée avant la dégradation du PCP. Cette latence augmente avec la concentration initiale en PCP mais pas de façon linéaire (voir figure 3.9). En effet, en utilisant les valeurs obtenues lors du test de toxicité à la

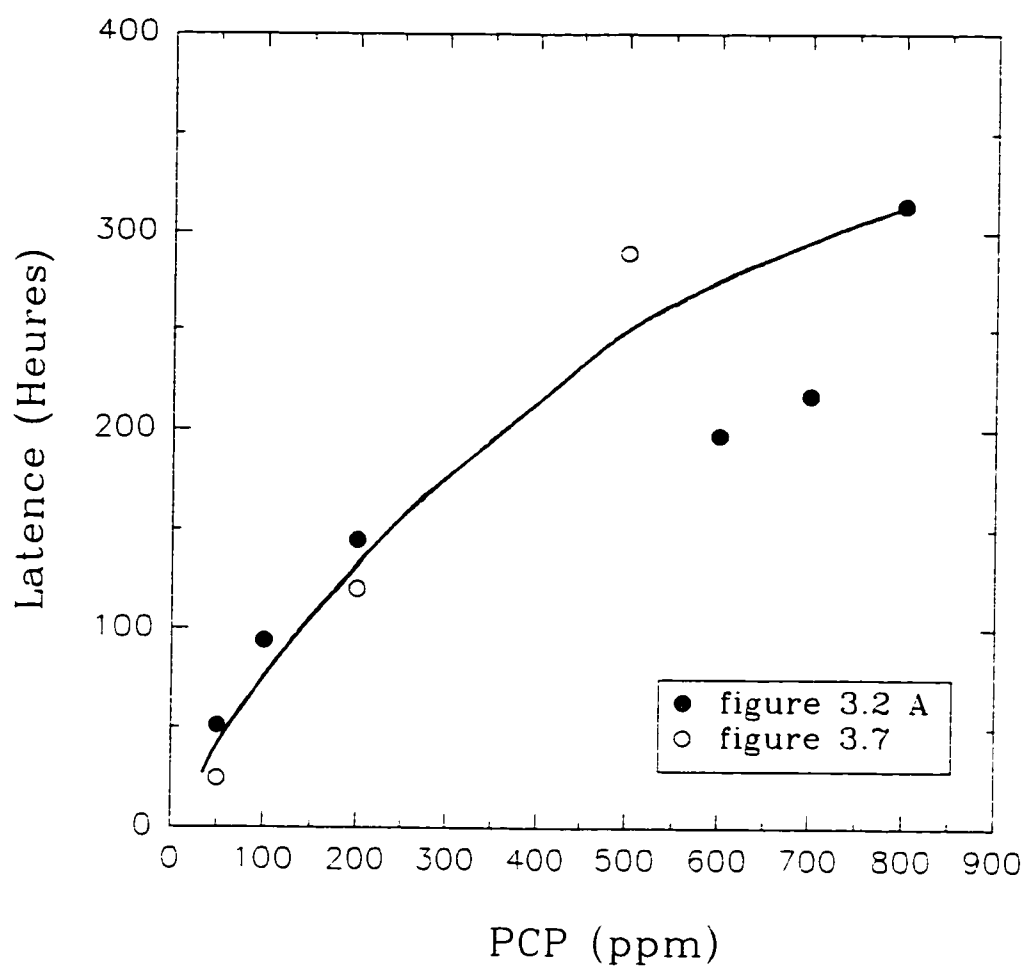


Figure 3.9 : Latence moyenne observée avant la dégradation du PCP

dégradation du PCP (figure 3.2 (A)) et celles de la figure 3.7, une latence moyenne en fonction de la concentration initiale en PCP a été tracée. Cette période de latence correspond à une adaptation des microorganismes à la quantité de PCP.

Les taux de dégradation spécifiques et non-spécifiques calculés pour des concentrations initiales en PCP de 50, 200 et 500 ppm sont représentés à la figure 3.10. L'évaluation de ces taux exclut la phase de latence, c'est-à-dire que seulement la partie linéaire de dégradation est considérée. Le taux de dégradation spécifique est estimé en divisant le taux de dégradation par la concentration moyenne de la biomasse observée durant la période de dégradation.

Le taux de dégradation,  $r$ , augmente avec la concentration en PCP. Donc plus la quantité initiale en PCP est élevée, plus la dégradation est rapide. Il ne faut toutefois pas oublier que la latence augmente également avec la concentration en PCP. Pour ce qui est du taux spécifique de dégradation, il est d'ordre zéro entre 50 et 500 ppm de PCP avec une valeur moyenne de  $2.5 \times 10^{-11}$  mg PCP/cellule.h. En considérant que la cinétique d'enlèvement du PCP suit le modèle de Haldane (Klecka et Maier, 1985, Autenrieth et al., 1991, Radehaus et Schmidt, 1992), alors il peut être estimé que le taux

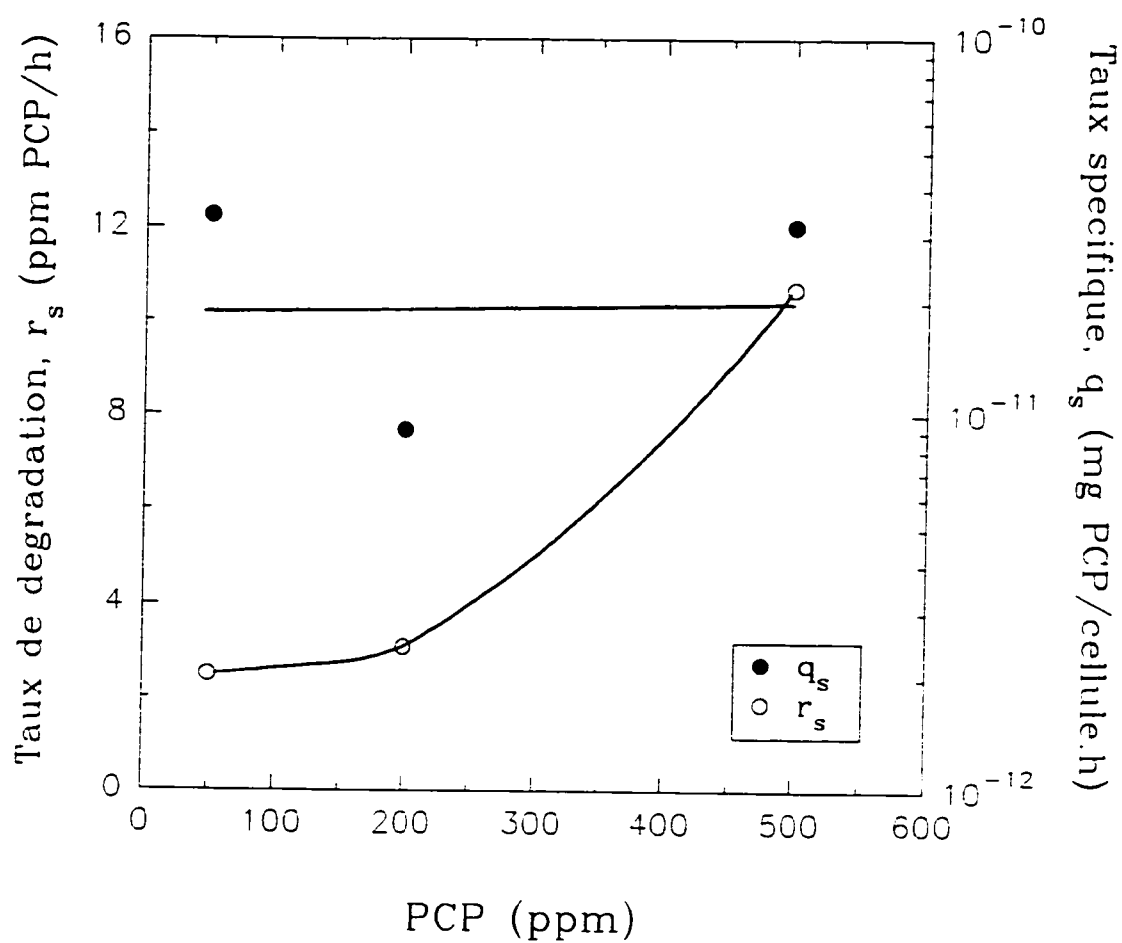


Figure 3.10 : Taux de dégradation spécifique et non spécifique du PCP lorsqu'inoculé directement du chemostat A

spécifique de dégradation de concentration en-deçà de 50 ppm serait d'ordre un et diminuerait graduellement au-delà de 500 ppm. Topp et al. (1988) ont trouvé un taux spécifique de dégradation de  $1.51 \times 10^{-13}$  mg PCP/cellule.h pour une souche de *Flavobacterium* lorsque le PCP, comme seule source de carbone, variait entre 70 et 150 mg/L.

#### **3.4.2 Effet d'un ajout de glucose dans l'inoculum sur la dégradation du PCP**

L'utilisation d'un co-substrat lors de la préparation d'un inoculum se traduit tout d'abord par l'augmentation de la concentration cellulaire totale. Afin de vérifier l'effet d'un ajout de glucose dans l'inoculum sur la dégradation du PCP, cinq flacons ont été inoculés avec différentes concentrations initiales en biomasse. Ces flacons ne contenaient que des sels minéraux et environ 50 ppm de PCP comme seule source de carbone. La population microbienne augmentée à l'aide de glucose variaient initialement entre  $7 \times 10^6$  et  $3.5 \times 10^9$  cellules/mL. Cette expérience permettra de comparer la latence ainsi que les taux spécifique et non-spécifique de dégradation du PCP obtenus lorsqu'un co-substrat est ajouté ou non au milieu de culture.

La dégradation du PCP dans le temps pour les différentes

concentrations initiales en biomasse est représentée à la figure 3.11 (A). De cette figure, il semble que pour des concentrations inférieures ou égales à  $7 \times 10^6$  cellules/mL, aucune dégradation n'est observée en 350 heures. Pour des concentrations initiales en biomasse supérieures, la dégradation du PCP est précédée d'une latence. Ces latences ne sont pas vraiment visibles à la figure 3.11 (A), mais lorsque représentées séparément, les diverses courbes comportent bien une phase de latence très distincte (voir annexe 4).

Ces latences ont été reportées et comparées à celles mesurées en absence de co-substrat (voir figure 3.12). En présence de glucose, la latence augmente en diminuant la concentration cellulaire initiale pour atteindre un plateau à 42 heures entre  $7 \times 10^8$  et  $3.5 \times 10^7$  cellules/mL. Puisqu'aucune dégradation du PCP n'a été observée lorsque la concentration initiale était de  $7 \times 10^6$  cellules/mL, il faut en déduire que la latence est infinie à des concentrations égales ou supérieures au nombre indiqué. Lorsque les cellules n'ont pas été en présence de glucose, une latence moyenne de 39 heures est observée pour une concentration microbienne initiale d'environ  $1.4 \times 10^6$  cellules/mL. Si cette concentration était plus élevée, la latence serait probablement plus courte comme il a été observé avec l'ajout de glucose dans l'inoculum.

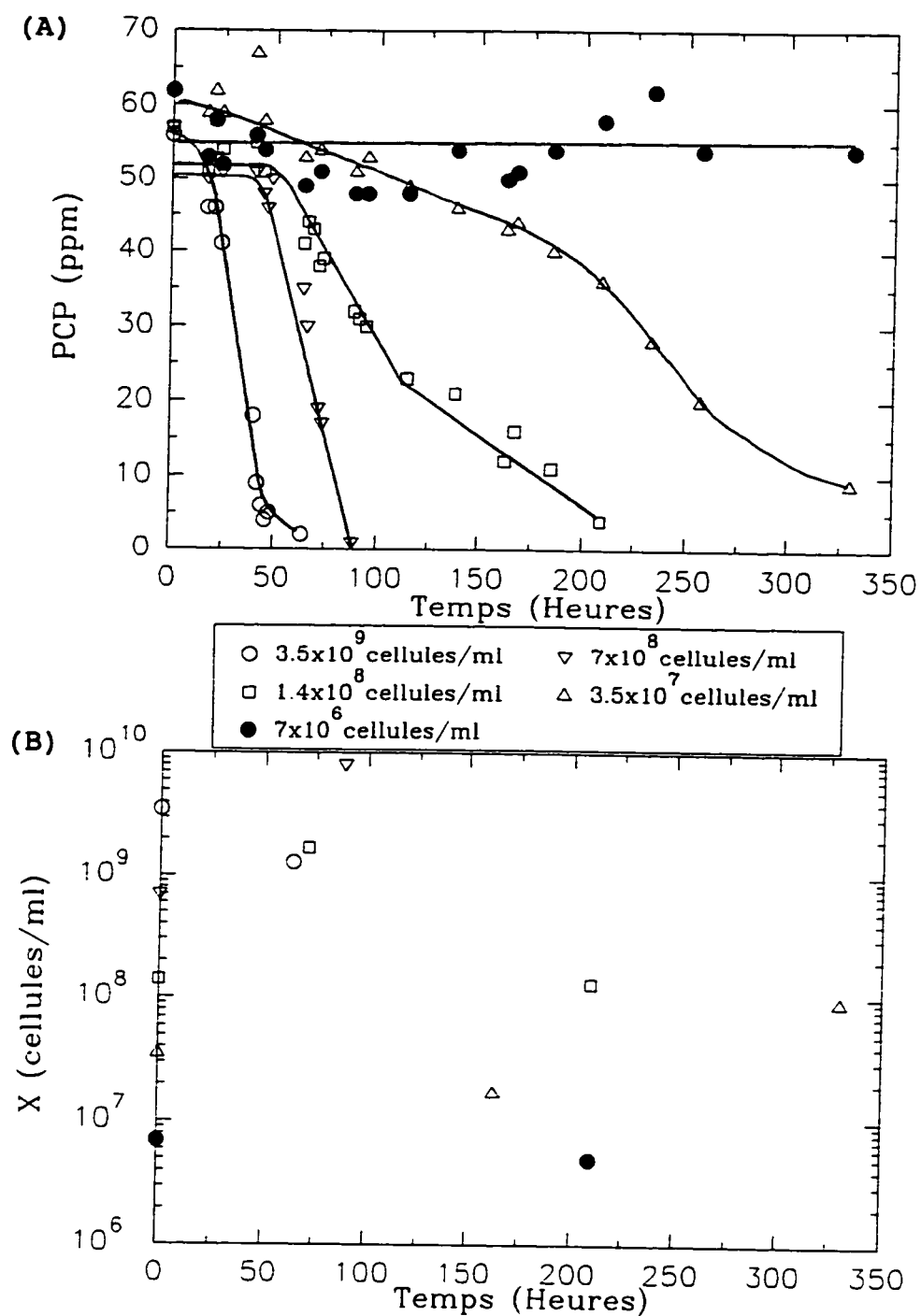


Figure 3.11 : Dégradation du PCP par différentes concentrations initiales en biomasse (A) et évolution de la biomasse totale (B) (inoculum préparé avec glucose)

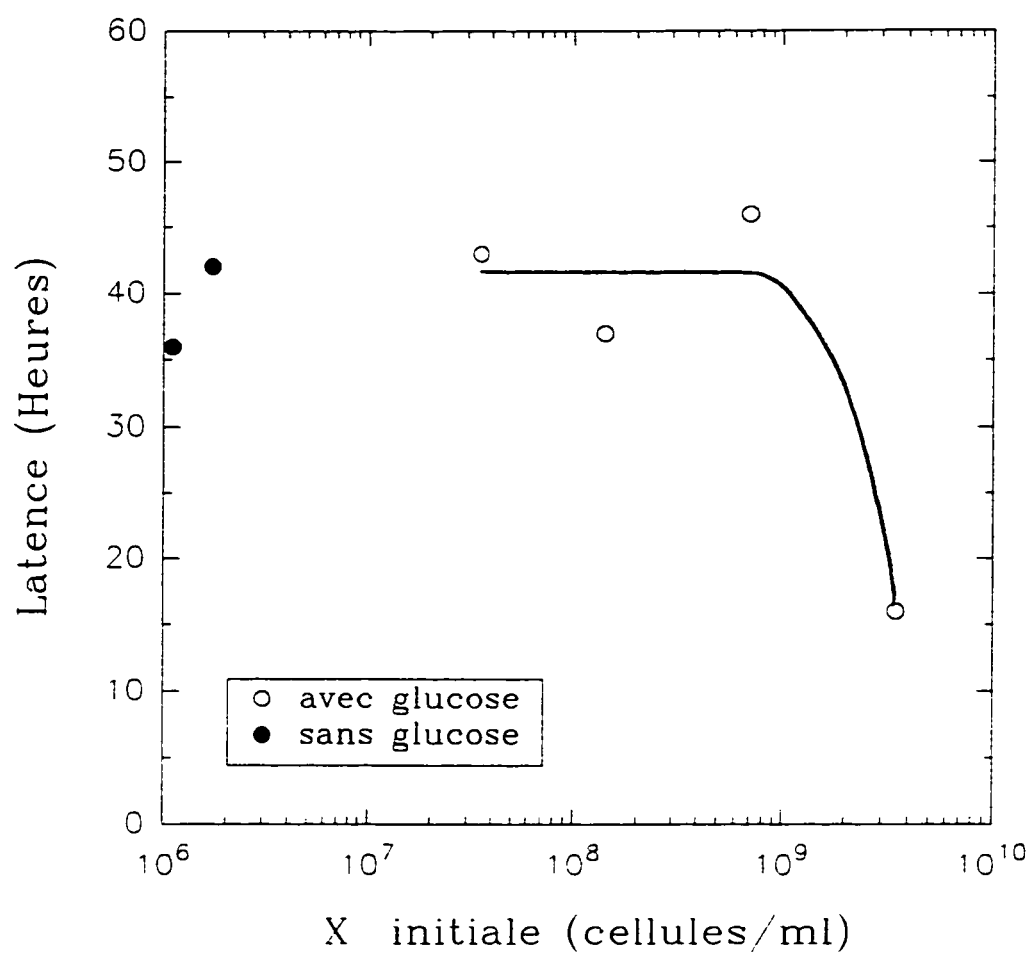


Figure 3.12 : Comparaison des latences avec et sans la présence de glucose dans l'inoculum



Ces latences de façon générale diffèrent selon la préparation de l'inoculum. En fait, la population microbienne n'est pas la même lorsqu'un ajout de glucose est effectué. En ajoutant une source de carbone facilement assimilable au départ, des microorganismes du consortium pouvant tolérer le PCP sans toutefois le dégrader vont peut-être croître plus rapidement que les bactéries pouvant dégrader le PCP.

Dans le cas d'une culture pure, si les gènes responsables de la dégradation du PCP ne sont pas perdus lors de la division cellulaire, l'ajout d'un co-substrat facilement dégradable a pour effet d'augmenter les bactéries qui dès le départ pouvaient dégrader le PCP. Cette ajout aura donc un effet positif sur la durée de la latence en la diminuant ou en l'éliminant. De la même façon, le taux de dégradation du PCP devrait augmenter dans ce cas puisqu'il y aura plus de microorganismes pouvant dégrader le PCP. Comme il a été mentionné auparavant, l'ajout d'un co-substrat à un consortium n'a pas le même effet que lorsqu'ajouté à une souche pure.

En ce qui concerne les taux de dégradation, il semble que ces derniers augmentent de façon linéaire avec la concentration initiale en biomasse (voir figure 3.13). Cette interprétation est possible en considérant les erreurs de mesures et le peu de points disponibles.

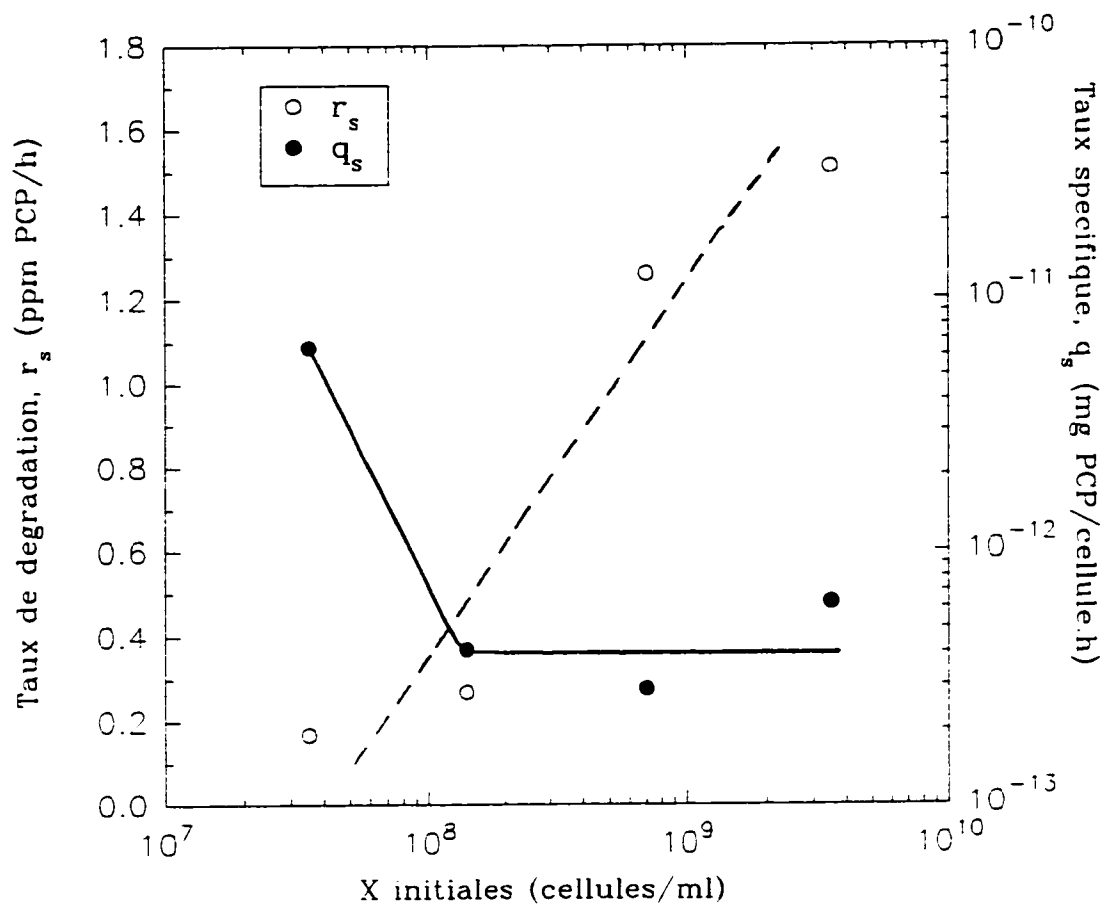


Figure 3.13 : Taux de dégradation spécifique et non-spécifique du PCP pour différentes concentrations initiales en biomasse (inoculum préparé avec glucose)

De cette même figure, il est possible de constater que le taux de dégradation spécifique du PCP est d'ordre zéro entre  $3.5 \times 10^9$  et  $1.4 \times 10^8$  cellules/mL, avec une valeur moyenne de  $4.4 \times 10^{-13}$  mg PCP/cellule.h, puis augmente avec une concentration initiale de  $3.5 \times 10^7$  cellules/mL. Cette hausse n'est pas attribuable à l'erreur sur la mesure mais peut être expliquée par une concentration moyenne plus faible des microorganismes présents dans ce milieu comparativement aux autres flacons. Comme il a été montré à la figure 3.11 (B), le suivi de la biomasse totale dans le temps a permis de calculer une valeur moyenne dans chacun des cas. Ces estimations sont reportées au tableau 3.7. Plus la concentration cellulaire utilisée pour le calcul de  $q_s$  est faible, plus ce taux sera élevé et ce même si le taux de dégradation,  $r_s$ , diminue car le changement de ce dernier est mathématiquement moins important que l'autre. En effet, le taux de dégradation des flacons contenant initialement  $1.4 \times 10^8$  et  $3.4 \times 10^7$  cellules/mL sont respectivement de 0.27 et 0.17 ppm PCP/h tandis que la concentration moyenne en biomasse mesurée est de  $6.6 \times 10^8$  et de  $2.6 \times 10^7$  cellules/mL. On voit bien que la baisse importante de la concentration cellulaire a plus d'effet sur le calcul de  $q_s$  que la baisse de  $r_s$ .

Tableau 3.7 : X moyenne lors de la dégradation de 50 ppm de PCP par des X initiales différentes

X initiale (cellules/mL)	X moyenne (cellules/mL)
$3.5 \times 10^9$	$2.4 \times 10^9$
$7.0 \times 10^8$	$4.4 \times 10^9$
$1.4 \times 10^8$	$6.6 \times 10^8$
$3.5 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$
$7.0 \times 10^6$	$6.0 \times 10^6$

En comparant avec des microorganismes provenant directement du chemostat, donc en absence de co-substrat, le taux spécifique de dégradation est plus élevé que lorsque mis en présence de glucose. À la figure 3.10, le taux spécifique de dégradation de 50 ppm de PCP comme seule source de carbone a été déterminé à  $3.4 \times 10^{-11}$  mg PCP/cellule.h. Dans ce cas, la concentration initiale en biomasse totale était de  $1.1 \times 10^6$  cellules/mL. Lorsque les cellules ont été en présence de glucose, le taux spécifique de dégradation le plus élevé est de  $6.5 \times 10^{-12}$  mg PCP/cellule.h. Ceci prouve encore qu'en ajoutant un co-substrat, la population microbienne diffère des cellules initialement retrouvées dans le chemostat et qu'une partie de ces microorganismes tolère le PCP sans toutefois le dégrader.

Ceci expliquerait le taux de dégradation spécifique plus faible.

### 3.5 EXPÉRIENCES EN CUVÉE ALIMENTÉE

Une étude cinétique sur la dégradation du PCP n'a pu être menée par un mode de culture en continu puisqu'un lavage de la biomasse était prévu à des taux de dilution élevés. En effet, de par la nature du PCP, une inhibition par le substrat surviendrait lorsque la concentration en PCP augmenterait avec le taux de dilution. Afin de pallier à ce problème, un procédé en cuvette alimentée a permis d'étudier la cinétique d'enlèvement du PCP dans des conditions ressemblant à celles retrouvées en continu. Pour ce faire, un flacon contenant initialement des sels minéraux, 50 ppm de PCP et dans un cas seulement 1 g/L de glucose était inoculé avec un certain volume du chemostat A. Lorsque tout le PCP était dégradé, un ajout était effectué à l'aide d'une solution concentrée en PCP. Cet ajout était répété jusqu'à la fin de l'expérience.

Les figures 3.14 à 3.16 illustrent le suivi du PCP dans le temps lors de 6 essais de flacons opérés en cuvette alimentée. Des ajouts d'environ 50 (figures 3.14 et 3.15), 100 (figures 3.16 et 3.17), 150 (figure 3.18) et de 200 ppm de PCP (figure 3.19) ont été effectués après la dégradation du premier 50 ppm

de ce même produit. La concentration de départ en PCP a été fixée à 50 ppm puisque c'est la concentration minimale qui a été testée et à laquelle la latence et la dégradation se produisent dans un temps respectable. Lors d'une expérience seulement (figure 3.17), la fiole contenait au départ un milieu de sels minéraux, 50 ppm de PCP et 1 g/L de glucose. Par la suite, l'ajout effectué de 100 ppm ne contenait que des sels minéraux et du PCP comme pour les autres essais.

La première cuvée alimentée avec ajout de 50 ppm de PCP, illustrée à la figure 3.14, a été réalisée quelques mois avant les autres essais effectués simultanément. Durant cette période, le consortium a subi quelques changements puisqu'il est toujours en évolution. De plus, un problème de solubilité du PCP est survenu lors du deuxième bloc d'essais empêchant ainsi la préparation d'une solution très concentrée pour effectuer les ajouts. Ceci s'est donc traduit par une dilution importante du milieu de culture lors d'ajouts de 150 et 200 ppm de PCP.

### **3.5.1 Évolution de la biomasse**

Lors du premier essai, un suivi de la concentration totale en biomasse a été réalisée durant 500 heures d'expérimentation (voir figure 3.14 (B)).

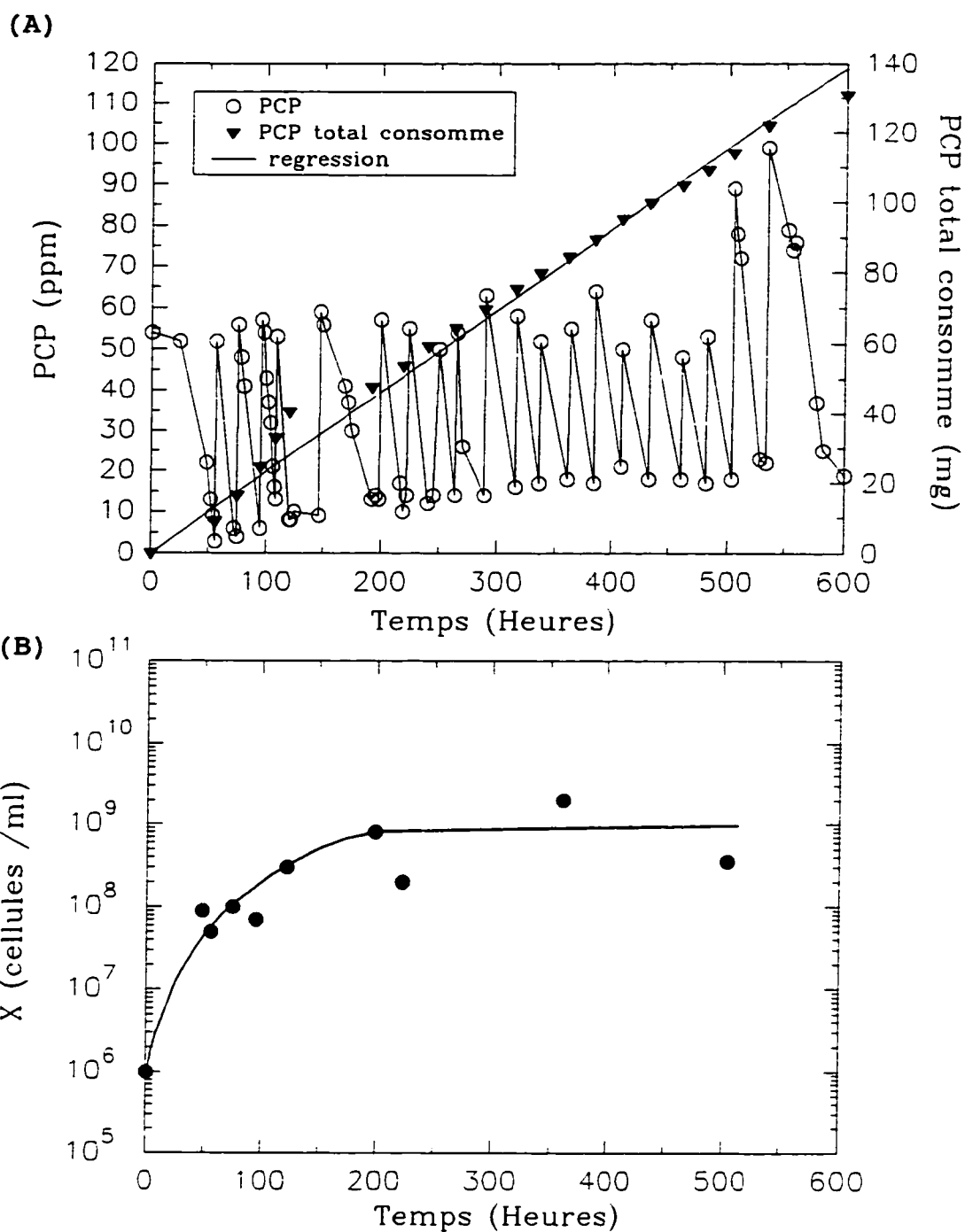


Figure 3.14 : Dégradation du PCP (A) et évolution de la biomasse totale (B) en cuvette alimentée avec ajouts de 50 ppm de PCP

Une importante augmentation de la concentration cellulaire totale est observée lors de la dégradation du premier 50 ppm de PCP. Par la suite, il y a stabilisation à environ  $10^9$  cellules/mL après 200 heures. Les microorganismes sont donc en phase stationnaire de leur courbe de croissance. Une phase de déclin n'a pas été observée car la quantité de PCP ajoutée au flacon était toujours similaire d'une fois à l'autre et que, en aucun cas, les cellules étaient privées de la source de carbone disponible.

Lors des autres cuvées alimentées, la concentration microbienne n'a été mesurée qu'en fin d'expérience. Cette mesure a été considérée comme étant la concentration en phase stationnaire.

### **3.5.2 Évolution de la concentration en PCP**

Lors des 6 essais réalisés en cuvée alimentée, une latence a été observée lors de la dégradation du premier 50 ppm de PCP. Cependant, dès le premier ajout, le PCP était dégradé tout de suite, sans latence, sauf pour le dernier essai où une période d'environ 40 heures s'est écoulée avant que la dégradation ne se produise.

Deux expériences ont été entreprises en effectuant des ajouts



de 50 ppm de PCP. Le suivi dans le temps de la concentration en PCP lors de ces deux essais est représenté aux figures 3.14 (A) et 3.15.

Lors de la première expérience (figure 3.14 (A)), une latence de 36 heures est observée avant la dégradation du premier 50 ppm de PCP. Cette dégradation s'est produite selon un taux de 2.5 ppm PCP/h. Par la suite, comme mentionné précédemment, le PCP est dégradé sans latence. Cette dégradation est d'ailleurs très rapide. En effet, comme observé à 96 heures, les 50 ppm de PCP étaient presque tout dégradés par les microorganismes en 12.5 heures, soit selon un taux de 3.7 ppm PCP/h. Malgré cette dégradation rapide, seulement qu'un ajout par jour était effectué puisqu'un apport continu en PCP à toutes les 12 heures pendant 500 heures ne pouvait être effectué manuellement. Cette façon de procéder n'affectait en rien la biomasse présente dans le flacon expérimental puisqu'elle n'était privée de source de carbone que pour quelques heures seulement. D'ailleurs, à 120.5 heures, les microorganismes ont été privés de PCP pour une période beaucoup plus longue, soit 26 heures. Une faible baisse de la concentration cellulaire a alors été enregistrée (non montrée à la figure 3.14 (B)) indiquant qu'une telle absence en source de carbone entraînait une certaine mortalité. Toutefois, la concentration totale en biomasse s'est vite rétablie.

En fin d'expérience, des apports plus élevés en PCP ont été effectués pour vérifier si une latence serait observée en augmentant la concentration en PCP ajouté au milieu. La dégradation de 90 ppm et 100 ppm de PCP s'est effectuée sans latence et avec un taux similaire, soit de 2.4 ppm PCP/h et 1.4 ppm PCP/h respectivement. Les cellules semblent, après plusieurs dégradations en série de 50 ppm de PCP, être adaptées à dégrader des concentrations plus élevées, soit de l'ordre de 100 ppm. Reste à savoir maintenant, si après une seule dégradation de 50 ppm de PCP, la biomasse pourrait dégrader, sans latence, des concentrations plus élevées en PCP que celle initialement présente dans le milieu. Pour répondre à cette question, cinq cuvées alimentées ont été effectuées simultanément. La différence se traduisait par des ajouts en PCP qui variaient entre 50, 100, 150 et 200 ppm. De plus, lors d'un essai où l'ajout était de 100 ppm de PCP, la fiole contenait initialement 1 g/L de glucose. L'effet d'un co-substrat sur la dégradation du PCP en cuvée alimentée a donc été vérifié.

L'ajout de 50 ppm de PCP lors du deuxième bloc d'essais en cuvée alimentée (figure 3.15) servait en quelque sorte de flacon témoin puisqu'une dégradation sans latence avait déjà été observée en opérant de cette façon. Il permettait également de vérifier si une certaine reproductibilité était

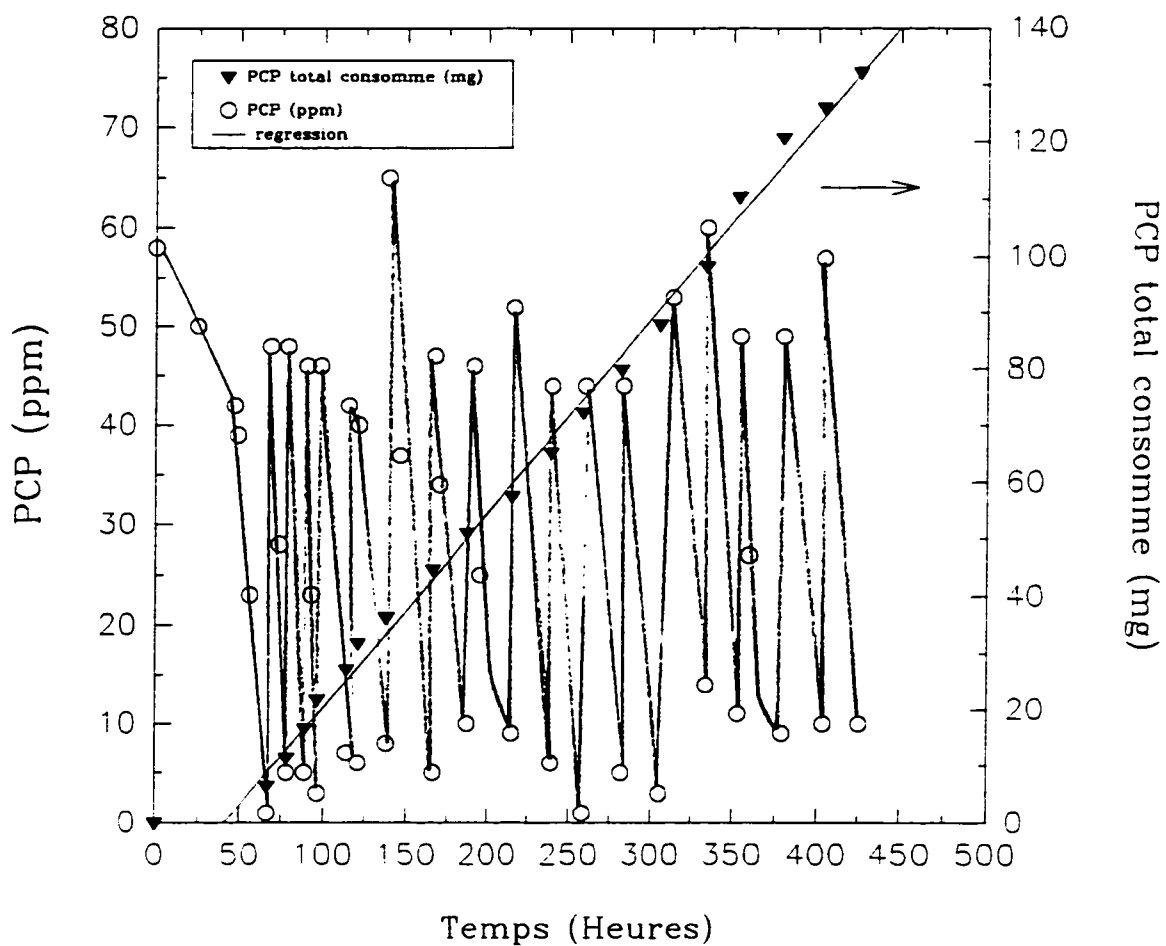


Figure 3.15 : Dégradation du PCP en cuvette alimentée avec ajouts de 50 ppm de PCP (deuxième essai)

possible même si le consortium est en évolution constante dans le temps. La figure 3.15 montre qu'une latence est observée lors de la dégradation du premier 50 ppm de PCP. Au moment des ajouts subséquents, la dégradation s'effectue rapidement sans période de latence. La durée de la latence est d'environ 40 heures et le taux de dégradation du premier 50 ppm est de 2.1 ppm PCP/h. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors du premier essai en cuvée alimentée.

Lors d'ajouts moyens de 100 ppm de PCP, aucune latence n'a été observée après la dégradation du premier 50 ppm de PCP comme seule source de carbone (voir figure 3.16). Au sixième ajout, soit à 365 heures, le taux de dégradation du PCP a augmenté et s'est maintenu constant à une valeur d'environ 4.2 ppm PCP/h. Un apport final en PCP de 165 ppm n'a pas entraîné l'apparition d'une latence mais a quelque peu diminué le taux de dégradation à 3.2 ppm PCP/h. Après 425 heures d'opération, 117 mg de PCP avaient été consommés en ajoutant ce dernier par tranche de 100 ppm. Cette quantité totale consommée servira à calculer des taux de dégradation spécifiques et non spécifiques subséquentement.

Lorsque du glucose était ajouté au milieu initial (voir figure 3.17), la latence observée lors de la dégradation du premier 50 ppm de PCP était d'environ 47 heures. La durée de la

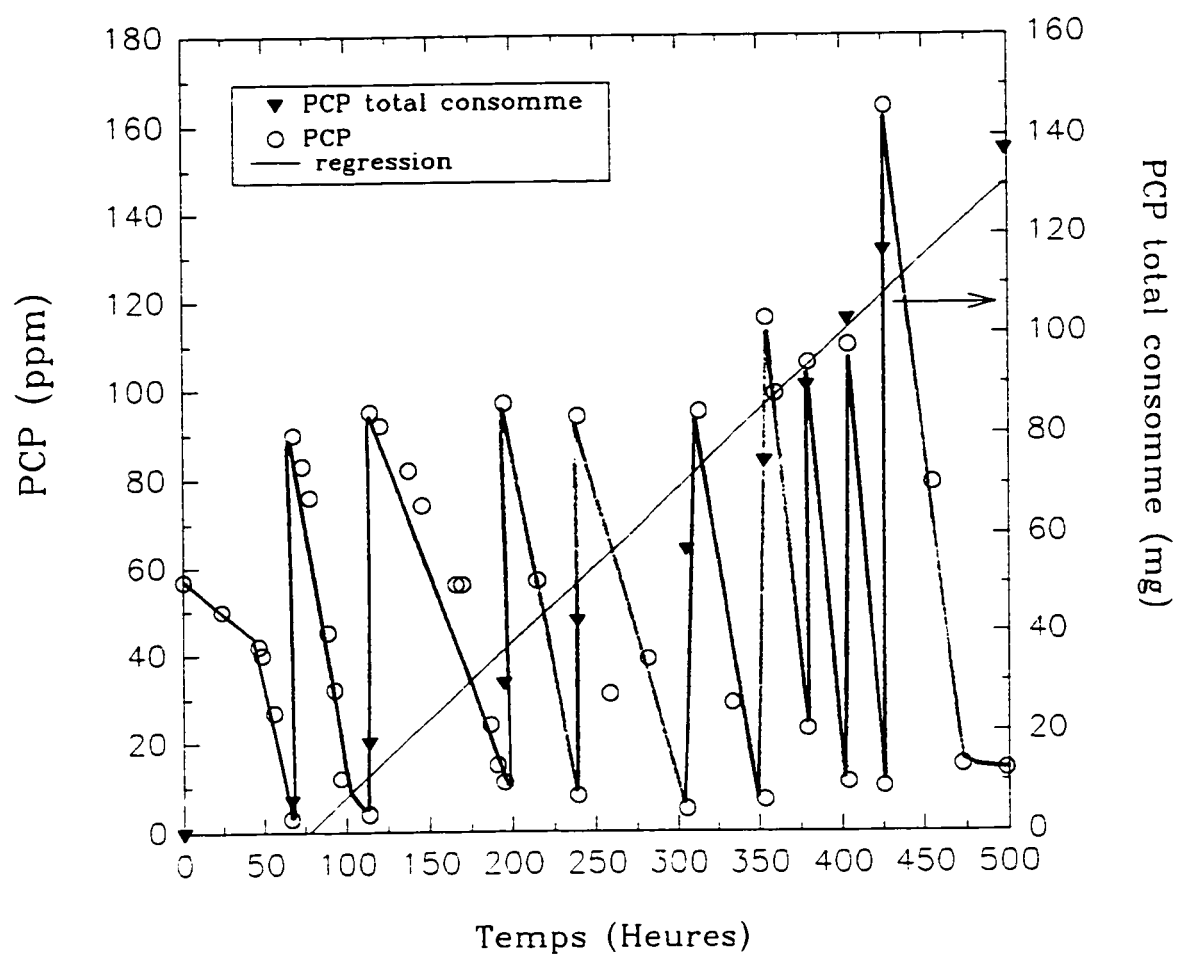


Figure 3.16 : Dégradation du PCP en cuvée alimentée avec ajouts de 100 ppm de PCP

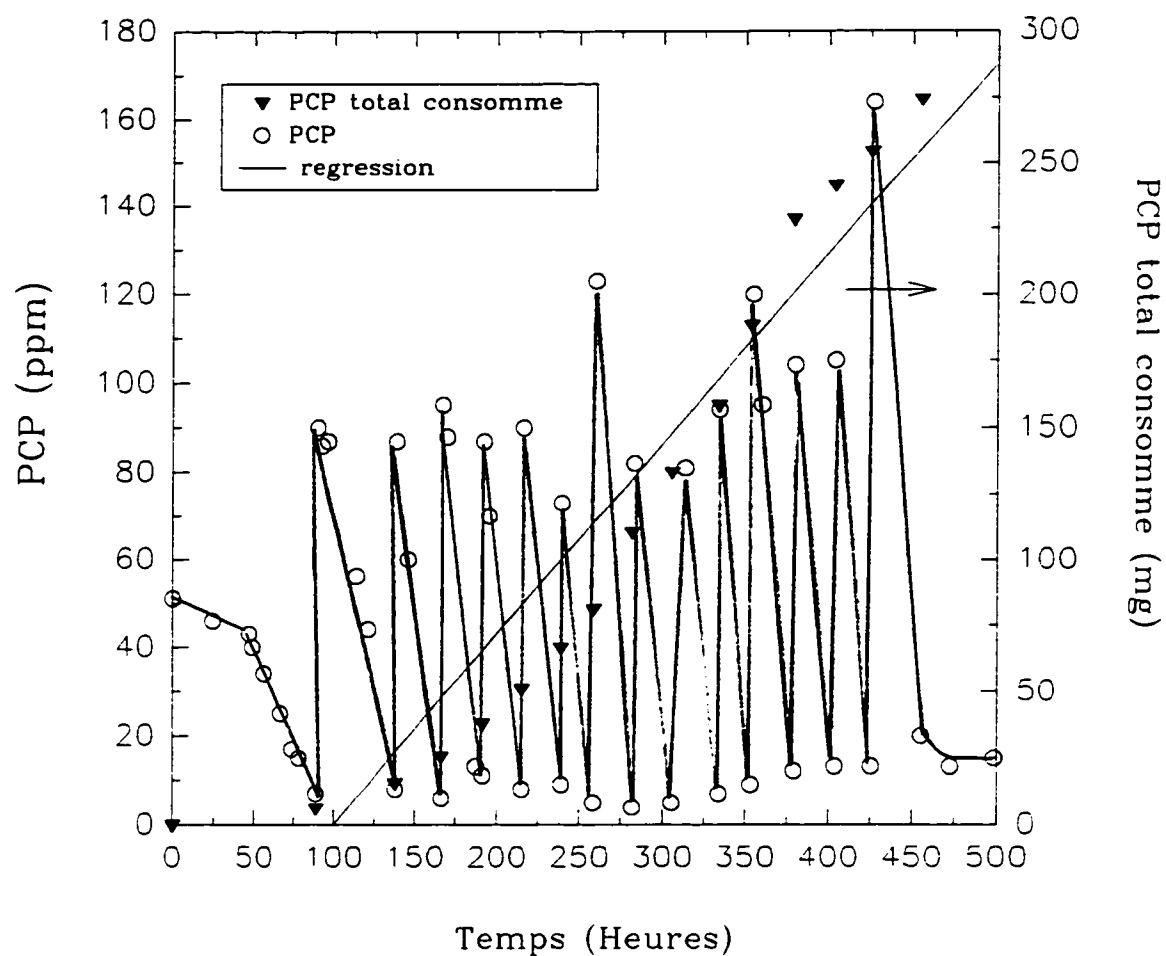


Figure 3.17 : Dégradation du PCP en cuvée alimentée avec ajouts de 100 ppm de PCP (présence de glucose avec les 50 ppm de PCP de départ)

latence est un peu plus élevée, soit environ 7 heures de plus que sans présence de co-substrat initialement, car les microorganismes consomment la source facilement dégradable en premier, soit le glucose, et par la suite, le PCP. Lors du premier ajout de 100 ppm de PCP comme seule source de carbone, aucune latence n'a été observée et la dégradation était rapide. En fait, au moment du premier ajout, le taux de dégradation était 1.7 ppm PCP/h mais par la suite, lors d'ajout moyen de 100 ppm de PCP, ce taux était d'environ de 4.0 ppm PCP/h. En fin d'expérience, un ajout de 165 ppm a été effectué. La dégradation s'est effectuée selon un taux de 5.0 ppm PCP/h, et ce sans latence. En augmentant la concentration microbienne par la présence de glucose en tout début d'expérimentation, soit avec le 50 ppm de PCP de départ, 255 mg de PCP ont été dégradés en environ 425 heures, soit 2.2 fois plus que sans glucose au départ. En cuvée, selon les résultats de la figure 3.2 (A), il a fallu un peu plus de 300 heures pour dégrader 700 ppm de PCP, soit environ 80 mg de PCP. Ceci est dû à la durée de la latence en cuvée.

Lors d'ajouts de 150 ppm de PCP, aucune latence n'a été observé après la disparition du 50 ppm de départ, mais plutôt deux taux de dégradation différents. Comme représentée à la figure 3.18, une faible dégradation est observée au départ, puis une plus rapide suit.

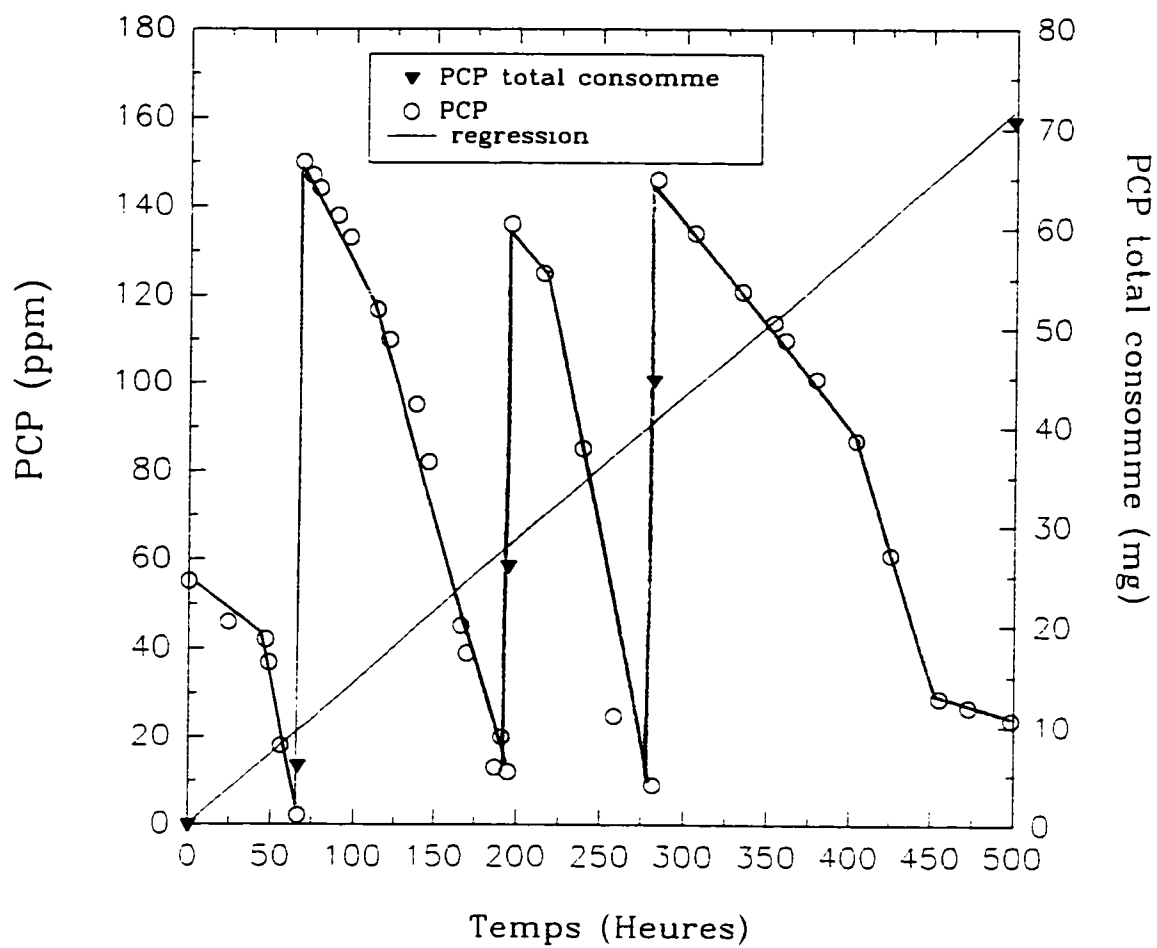


Figure 3.18 : Dégradation du PCP en cuvée alimentée avec ajouts de 150 ppm de PCP



Ces deux taux différents sont d'ailleurs plus marqués lors du dernier ajout de PCP.

Une situation similaire s'est produite lors du premier ajout de 200 ppm (voir figure 3.19). Au départ, une latence d'environ 45 heures a précédé un taux de dégradation de 0.64 ppm PCP/h. Puis, au temps 195 heures, le taux de dégradation a augmenté à 2.4 ppm PCP/h. Le deuxième ajout n'a été que de 140 ppm de PCP car lors du premier ajout de 200 ppm, le très grand volume ajouté au milieu a entraîné une dilution importante. Lors de cet ajout, le PCP a été dégradé directement, sans latence, et selon un taux d'environ 1.3 ppm PCP/h. Après ces deux ajouts, soit en 350 heures, environ 60 mg de PCP ont été dégradés. Lors d'ajouts de 150 ppm (figure 3.18), 50 mg de PCP ont été consommés en un temps similaire. Le comportement différent d'un ajout à l'autre lors de ces deux expériences peut s'expliquer de deux façons. En premier lieu, comme mentionné précédemment, une dilution non négligeable s'est produite lors des ajouts en PCP. En effet, puisque la solution servant à effectuer les ajouts n'était pas très concentrée, un grand volume était nécessaire pour ajuster la concentration en PCP à 150 ou 200 ppm. Cette dilution diminue la concentration microbienne et comme il a été montré à la section 3.5.2, la concentration en biomasse a un effet sur la latence et le taux de dégradation.

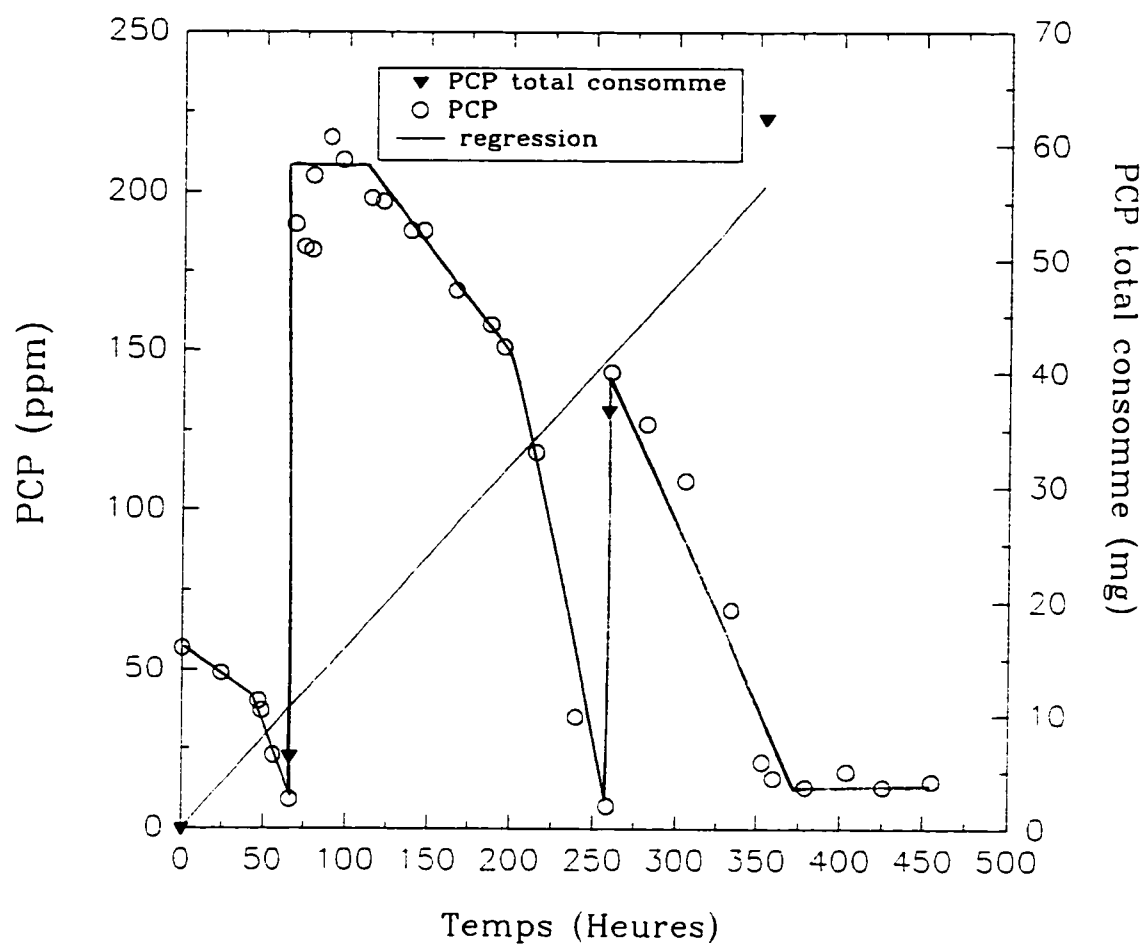


Figure 3.19 : Dégradation du PCP en cuvée alimentée avec ajouts de 200 ppm de PCP

En deuxième lieu, ce comportement peut s'expliquer par l'apport trop élevé en PCP après une dégradation de seulement 50 ppm. Les cellules doivent s'adapter à une concentration aussi élevée en PCP et la période d'adaptation se traduit par une latence ou une dégradation moins rapide. Pour mettre fin à cette période d'adaptation, il se peut qu'une certaine concentration cellulaire doit être atteinte, mais cela n'a pas été vérifiée.

Il est difficile de dissocier ces deux hypothèses pour expliquer le comportement observé. Pour ce faire, une expérience similaire devrait être entreprise en utilisant une solution très concentrée pour effectuer les ajouts en PCP. L'effet de dilution serait alors éliminé.

### **3.6 COMPARAISON DES ESSAIS EN CUVÉE ET EN CUVÉE ALIMENTÉE**

Il est possible de calculer des taux de dégradation spécifiques et non-spécifiques sur la durée totale des différents essais en cuvette alimentée. En effet, en considérant qu'une concentration moyenne en PCP est toujours présente dans le flacon expérimental, des taux globaux peuvent être calculés à partir de la quantité totale de PCP consommée dans le temps. La concentration en PCP présente en tout temps lors de l'expérimentation peut être considérée comme étant la

moitié de l'ajout moyen effectué. Ces taux peuvent alors être comparés à ceux calculés lors d'essais en cuvée.

Étant donné que la concentration initiale en biomasse influence le taux de dégradation du PCP, les taux comparés sont ceux calculés pour une concentration cellulaire initiale similaire.

### **3.6.1 Taux de dégradation non-spécifique du PCP**

Les taux de dégradation non-spécifiques du PCP,  $r$ , lorsque les cellules ont été mises initialement en présence (+) ou en absence (-) de glucose sont reportés à la figure 3.20.

En cuvée alimentée, le taux de dégradation du PCP sans glucose est de 2.4 ppm PCP/h entre 25 et 50 ppm de PCP. En augmentant la concentration en PCP, le  $r$ , diminue (voir figure 3.20). Ceci peut être dû à une dilution du milieu par un ajout de volume trop élevé dans ces deux dernières fioles expérimentales. En effet, des problèmes de solubilité ont empêché la préparation d'une solution très concentrée pour effectuer les ajouts en PCP. Il est donc difficile d'affirmer si la baisse des taux de dégradation est due à des ajouts trop élevés en PCP ou à une dilution trop importante du milieu.

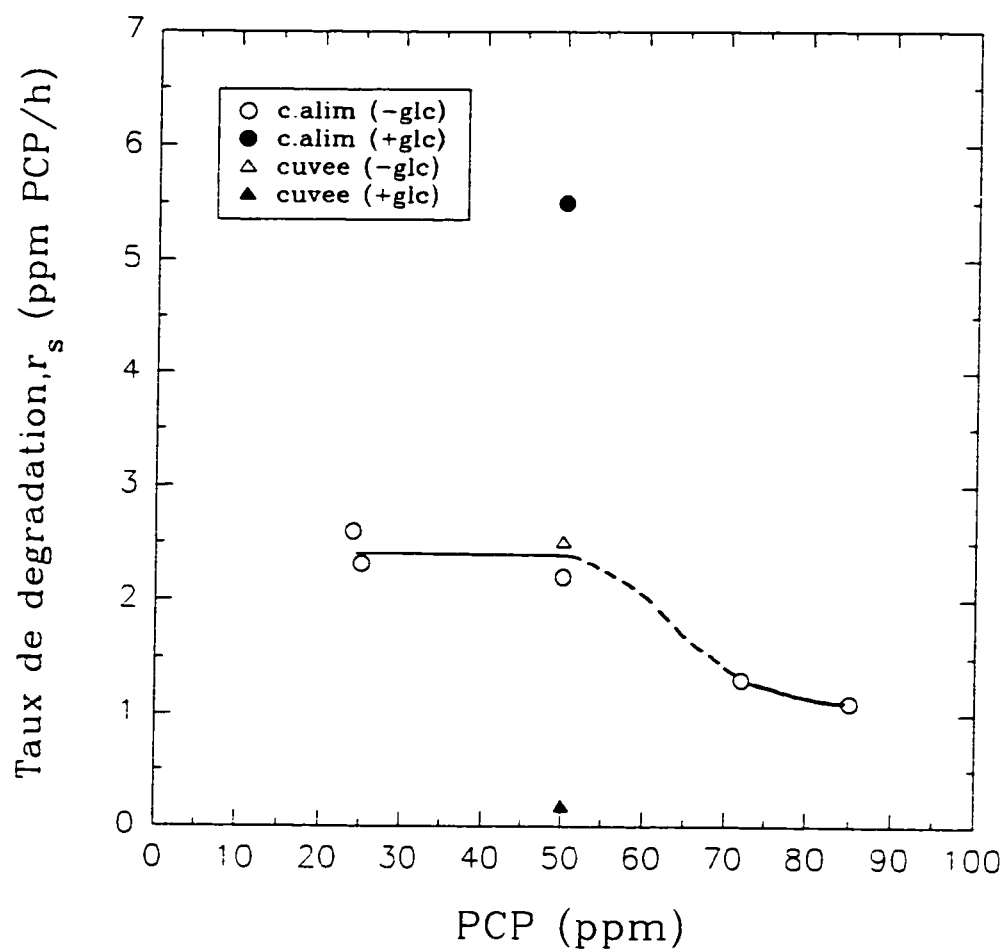


Figure 3.20 : Comparaison des taux de dégradation du PCP en cuvette et en cuvette alimentée en présence (+) ou en absence (-) de glucose initialement

En présence de glucose, le  $r$ , en cuvée alimentée est plus élevé que lorsque les microorganismes sont privés de co-substrat au départ. Un taux deux fois plus élevé a été observé lorsque le milieu contenait initialement 1 g/L de glucose. Ce taux plus élevé est sûrement dû à la concentration cellulaire qui est plus importante.

En comparant ces taux avec ceux calculés en cuvée, on remarque qu'en absence de glucose, les  $r$ , sont similaires à 50 ppm de PCP. Par contre, en cuvée, l'augmentation de la concentration en PCP entraîne également une augmentation du taux de dégradation contrairement à l'étude en cuvée alimentée (voir figure 3.10).

La présence d'un co-substrat en cuvée a tendance à diminuer la valeur de  $r$ . Le taux de dégradation calculé en cuvée est 32 fois plus faible que celui mesuré en cuvée alimentée. Le taux en cuvée est en fait celui que l'on pourrait observé lors d'un premier ajout en PCP en cuvée alimenté. Comme il a été mentionné précédemment, le taux de dégradation augmente légèrement avec le temps. Un taux plus faible en cuvée qu'en cuvée alimentée était donc prévu.

Selon les résultats, la dégradation de 50 ppm de PCP s'effectue plus rapidement en ajoutant du glucose dans le

milieu initial et en opérant le système à l'aide d'une cuvée alimentée.

### 3.6.2 Taux spécifique de dégradation du PCP

La figure 3.21 représente les taux spécifiques de dégradation calculés en cuvée alimentée et en cuvée en présence ou non de glucose dans le milieu initial.

En absence de glucose, les taux spécifiques de dégradation en cuvée alimentée ont une valeur moyenne de  $1.5 \times 10^{-11}$  mg PCP/cellule.heure entre 25 et 75 ppm de PCP puis diminue lorsque la concentration en PCP augmente. Cette baisse peut être due à une dilution du milieu ou à un ajout en PCP trop important comme mentionné auparavant.

En présence de 50 ppm de PCP et de glucose initialement, le  $q_s$  en cuvée alimentée est légèrement plus faible. Une concentration totale en biomasse plus élevée lors d'ajout d'un co-substrat facilement assimilable entraîne une baisse du taux spécifique de dégradation du PCP même si le  $r_s$  est plus élevé. L'explication principale de cette baisse est que ce ne sont pas tous les microorganismes qui ont crû qui dégradent le PCP.

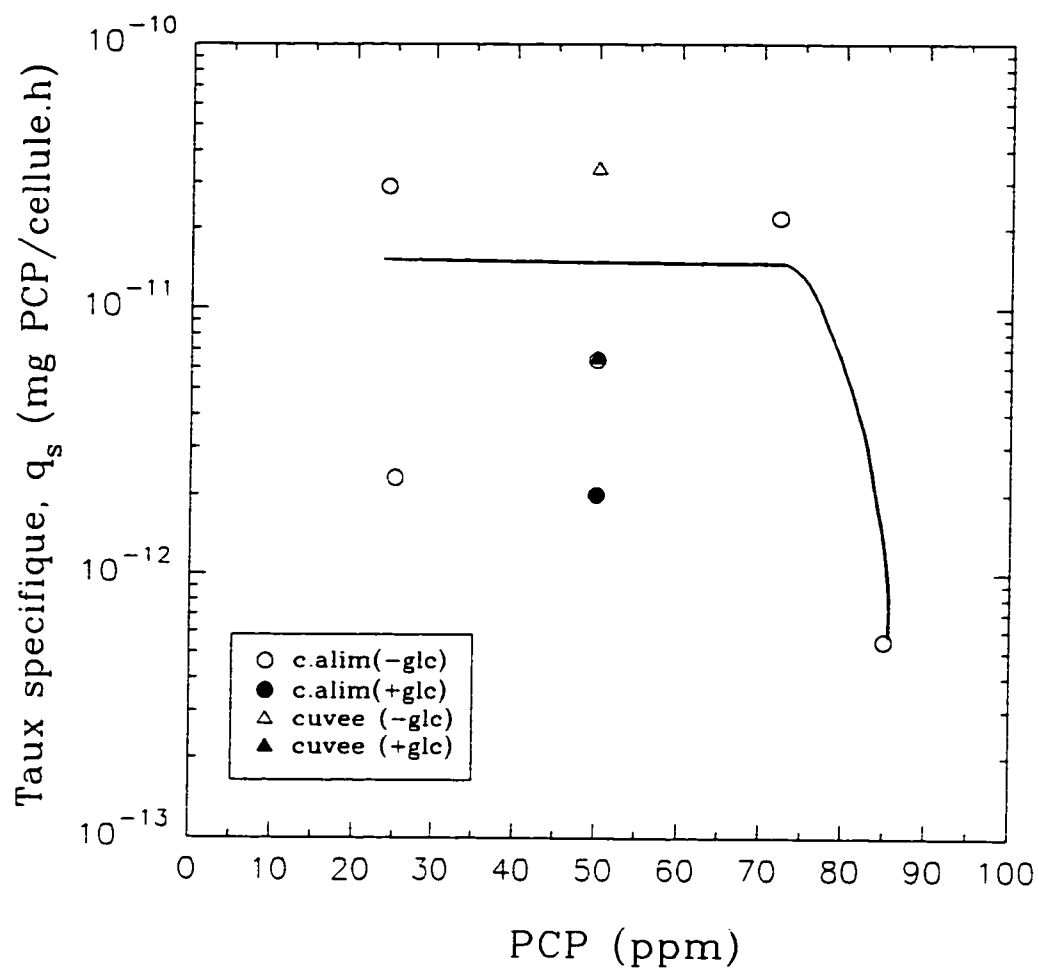


Figure 3.21 : Comparaison des taux spécifiques de dégradation du PCP en cuvette et en cuvette alimentée en présence (+) ou en absence (-) de glucose initialement



Les  $q$ , calculés pour la dégradation en cuvée de 50 ppm de PCP sont légèrement plus élevés qu'en cuvée alimentée et ce, avec ou sans la présence de glucose au départ.

De façon spécifique, une dégradation en cuvée, sans présence de glucose, donne de meilleurs résultats. Il faut dire également que la réciproque en cuvée alimentée suit de très près les résultats obtenus pour la dégradation spécifique de 50 ppm de PCP. L'ajout de glucose diminue de façon générale le  $q$ , car la concentration totale en biomasse est de beaucoup plus importante dans ce cas. Si l'expérience était réalisée à l'aide d'une culture pure, le taux spécifique de dégradation en cuvée et en cuvée alimentée du PCP serait plus élevé en présence de glucose car tous les microorganismes qui auraient crû davantage avec une source de carbone facilement dégradable pourraient dégrader le PCP. Pour un consortium, l'ajout d'un co-substrat, n'augmente pas nécessairement que les cellules qui dégradent le PCP mais également les microorganismes qui le tolèrent sans toutefois le dégrader.

### **3.6.3 Procédé proposé pour le traitement d'une eau contaminée au PCP**

Lors d'un traitement de sols contaminés, il arrive souvent que le sol soit lavé en faisant percoler de l'eau à travers celui-

ci. L'eau de lavage devient alors contaminées et elle doit être traitée à son tour. En se basant sur les divers résultats obtenus, un procédé est proposé pour le traitement d'une eau contaminée au PCP.

Premièrement, au niveau de la stratégie d'inoculation, un inoculum avec glucose est préférable afin d'augmenter la concentration cellulaire totale. Cette inoculum est préparé en ajoutant un certain volume du chemostat A à un milieu aqueux contenant des sels minéraux, du glucose et du PCP. Lorsque tout le PCP est dégradé, un volume quelconque est transféré au réacteur contenant l'eau contaminée. Plus la concentration cellulaire est élevée, plus la latence et le temps de dégradation seront courts. Il serait peut-être avantageux de concentrer l'inoculum avant de le transférer au réacteur. Cependant, cette étape entraînera des coûts supplémentaires qui devront être justifiés par des coûts inférieurs de traitement.

Au niveau du procédé, il semble qu'il est plus avantageux de traiter l'eau contaminée par un traitement en cuvée alimentée que par un traitement en cuvée. Lors de ce dernier procédé, même si le taux de dégradation augmente avec la concentration initiale en PCP (entre 50 et 500 ppm de PCP comme seule source de carbone), il ne faut pas oublier que la latence augmente

également et qu'elle n'est pas du tout négligeable. Cependant, lors d'un traitement en cuvette alimentée, une seule latence est observée au départ et par la suite, en ajoutant le PCP par tranche de 100 ppm, le contaminant est dégradé rapidement, sans latence. De la même façon, il serait intéressant de travailler en continu. Au départ, le réacteur serait opéré en cuvette, puis lorsque tout le PCP serait dégradé, une alimentation continue de l'eau contaminée serait effectuée. L'avantage de ce type de procédé est que l'eau est traitée en continu, donc aucun arrêt n'est nécessaire pour enlever l'eau traitée du réacteur. Pour cette raison, un traitement en continu est conseillé.

## CHAPITRE 4 : CONCLUSION

Les principaux résultats obtenus lors de cette étude sur la biodégradation du PCP en milieu aqueux sont résumés aux figures 4.1 et 4.2 et expliqués aux paragraphes suivants.

Des souches pures et deux consortiums ont été étudiés et comparés pour leur capacité à dégrader le PCP en milieu aqueux. Des six souches pures étudiées, seulement *Pseudomonas cepacia* a crû sur pétri dans un milieu de sels minéraux, de glucose et de différentes concentrations en PCP. Cependant, lors d'un test de dégradation en milieu similaire mais aqueux, cette bactérie a consommé le glucose mais n'a jamais dégradé le PCP. Il a été conclu que *P.cepacia* tolère le PCP mais ne peut l'utiliser comme source de carbone.

Deux consortiums ont été développés à partir de différentes sources contaminées au PCP. Une comparaison entre les deux a permis de déterminer que le consortium A était le plus performant car il dégradait en cuvée jusqu'à 800 ppm de PCP comme seule source de carbone tandis que le consortium B ne dégradait que 200 ppm de ce même produit. Cette différence s'explique en partie par des concentrations d'alimentation différentes aux deux réacteurs qui sont égales aux concentrations maximales dégradées par chacun d'eux.

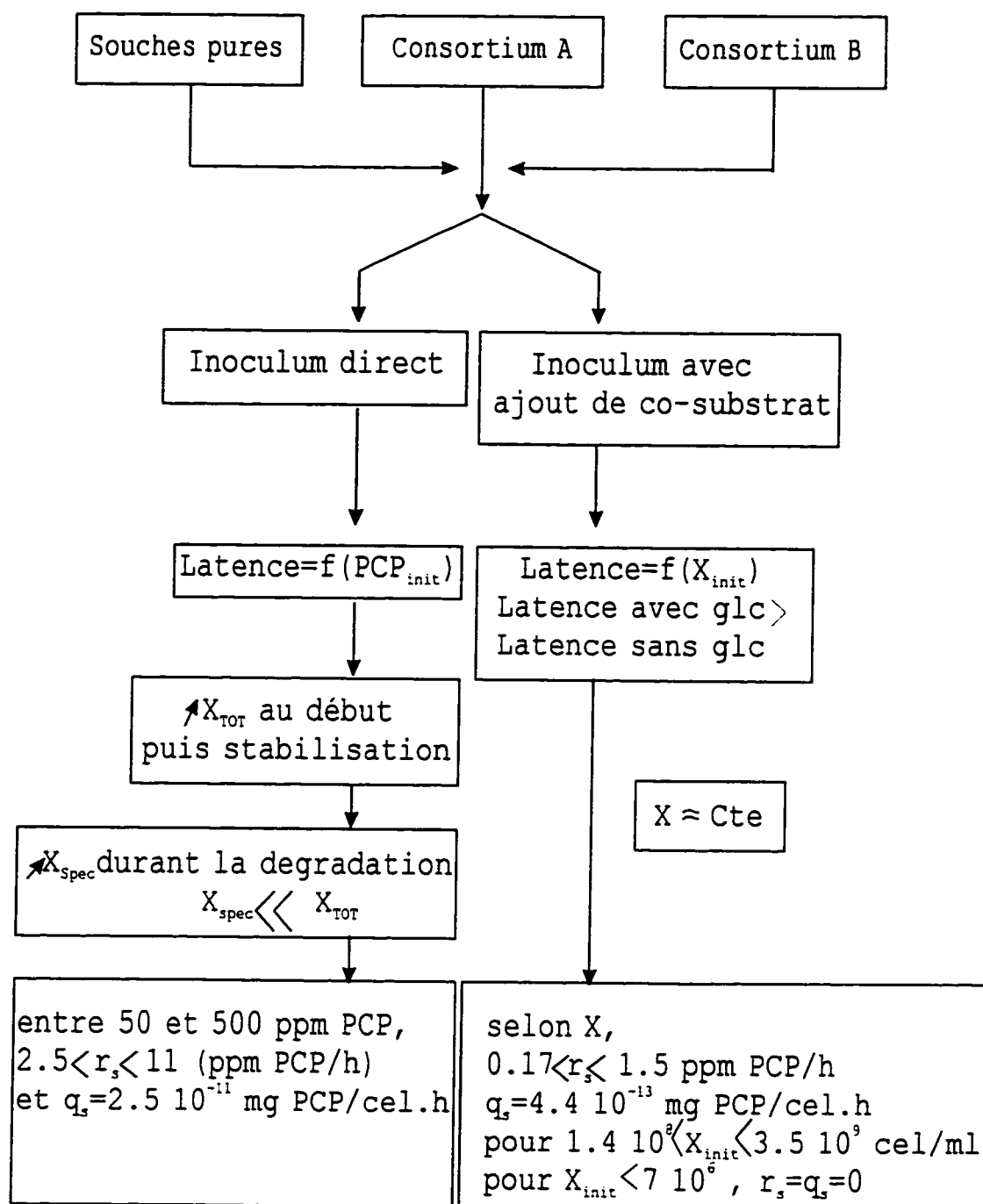


Figure 4.1 : Résumé des résultats en cuvée

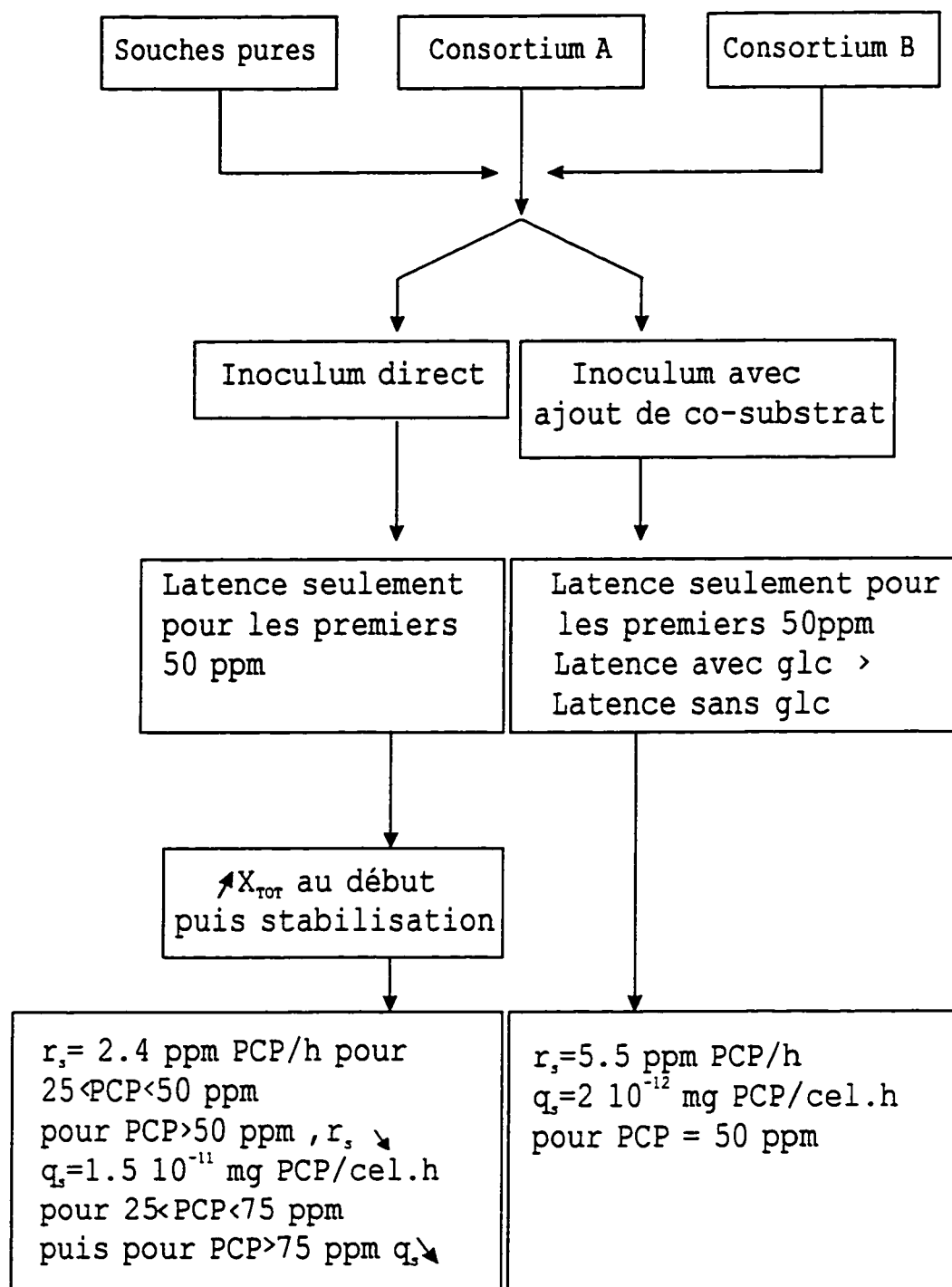


Figure 4.2 : Résumé des résultats en cuvée alimentée

L'adaptation du consortium A aux trois isomères de monochlorophénol améliore également son activité au niveau de la dégradation.

Des analyses au CG/SM ont montré que la concentration finale en PCP mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 319 nm était faussée par une coloration du milieu de culture. Ceci a pour effet de surestimer la concentration résiduelle retrouvée dans le milieu aqueux. Lors de tests réalisés à l'aide de PCP marqué, 70 % du  $^{14}\text{C}$ -PCP a été converti en  $^{14}\text{CO}_2$  en fin d'expérience. Ce résultat, comparable aux pourcentages retrouvés en littérature, indique que le PCP n'est pas que dégradé mais bien minéralisé lors des essais en milieu aqueux.

La stratégie d'inoculation des milieux de culture influence la capacité de dégradation du PCP. Deux sources d'inoculum ont été étudiées, soit l'inoculation directe à partir du chemostat et l'augmentation de la concentration cellulaire par l'ajout d'un co-substrat. Il a été déterminé que la source de carbone facilement assimilable, soit le glucose, devait être ajoutée au milieu de culture au départ avec les sels minéraux et le PCP. Cette expérience a par ailleurs montré que le glucose était consommé préférentiellement au PCP. À partir de ces deux types d'inoculation, des tests de dégradation en cuvée et en cuvée alimentée ont été entrepris.

Lors des tests où les flacons étaient inoculés directement à partir de chemostat et opérés en cuvée, il a été montré que la latence augmente avec la concentration initiale en PCP mais pas de façon linéaire. Cela indique que le temps requis pour induire les enzymes responsables de la dégradation du PCP est de plus en plus long selon la concentration de PCP traitée. La concentration cellulaire totale, soit toutes les cellules présentes dans le milieu de culture, augmente énormément entre le temps zéro et le début de la dégradation puis se stabilise. Cette augmentation correspond au temps où du carbone est disponible, soit sous forme de PCP ou de métabolites. Malheureusement, il n'a pu être déterminé par les expériences effectuées si la concentration totale en biomasse augmentait graduellement durant la latence ou seulement en tout début de dégradation. Cependant, au niveau des microorganismes qui dégradent spécifiquement le PCP, ceux-ci croissent principalement durant la période de dégradation. Cette croissance ne se reflète pas sur la mesure de la concentration cellulaire totale puisque le pourcentage des cellules spécifiques est très faible, soit de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  %. De plus, le taux de dégradation du PCP comme seule source de carbone augmente entre 50 et 500 ppm avec des valeurs se situant entre 2.5 et 11 ppm PCP/h. Par contre, le taux spécifique de dégradation est d'ordre zéro entre cette plage, avec une valeur moyenne de  $2.5 \times 10^{-11}$  mg PCP/cellule.h. Ce qui



veut dire qu'entre 50 et 500 ppm, peu importe la concentration en PCP, les cellules dégradent la même quantité de ce composé dans le temps.

L'influence de la concentration initiale en biomasse a été vérifiée en augmentant la concentration cellulaire par l'ajout de glucose dans l'inoculum. Les résultats ont montré qu'une latence moyenne de 42 heures a été observée, avant la dégradation de 50 ppm de PCP, lorsque la concentration cellulaire initiale variait entre  $3.5 \times 10^7$  et  $7 \times 10^8$  cellules/mL. Cette latence tend à diminuer en augmentant la concentration initiale en biomasse. Toutefois, la latence observée lorsque le PCP est la seule source de carbone est plus faible que lors d'ajout de glucose dans l'inoculum. Cela s'explique par le fait que la population microbienne diffère lorsqu'une source de carbone facilement assimilable est ajoutée au milieu de croissance. Malheureusement, aucune mesure de la biomasse spécifique n'a été effectuée pour vérifier cette affirmation. Lors de cette expérience, la concentration cellulaire totale est restée plus ou moins constante. En fait, elle était élevée dès le départ et il n'y avait que 50 ppm de PCP dans le milieu de culture, donc relativement très peu de source de carbone. Le taux de dégradation du PCP, dont les valeurs se situent entre 0.17 et 2.5 ppm PCP/h, augmente avec la concentration cellulaire.

Donc, plus il y a de microorganismes au départ, plus la dégradation est rapide. Cependant, ces cellules dégradent la même quantité de PCP dans le temps, puisque le taux de dégradation spécifique est d'ordre zéro, avec une valeur de  $4.4 \times 10^{-13}$  mg PCP/cellule.h lorsque la concentration initiale est entre  $1.4 \times 10^8$  et  $3.5 \times 10^9$  cellules/mL. Ces taux sont plus faibles que ceux observés en absence de glucose et s'expliquent également par un changement de la population microbienne lors d'ajout de glucose dans l'inoculum. Aucune dégradation n'a été observée lorsqu'initialement il n'y avait que  $7 \times 10^6$  cellules/mL.

Une étude en cuvette alimentée a été entreprise afin de simuler la dégradation du PCP en mode continu. Six flacons ont été opérés en cuvette alimentée en ajoutant dans chacun d'eux différentes concentrations en PCP, soit 50, 100, 150 et 200 ppm de PCP, après la dégradation d'un premier 50 ppm de ce même produit. Lors d'un essai où l'ajout était de 100 ppm, du glucose était présent dans le milieu initial afin de vérifier l'effet d'un co-substrat sur la dégradation.

Le suivi de la biomasse totale a permis d'observer que cette dernière augmentait beaucoup lors de la dégradation du premier 50 ppm puis se stabilisait graduellement.

Au niveau de la concentration en PCP, une latence a précédé la dégradation du premier 50 ppm de PCP puis, dès le premier ajout aucune latence n'a été observée. Les enzymes responsables de la dégradation étaient déjà induites alors le PCP était dégradé tout de suite, sans latence.

Des taux spécifiques et non spécifiques de dégradation du PCP ont été calculés à partir de la quantité totale dégradée lors de la durée de la cuvée alimentée. Afin de relier ces taux à ceux qui pourraient être calculés lors d'un procédé en continu, ces valeurs ont été attribuées à la concentration moyenne en PCP présente en tout temps dans le flacon.

Lorsque du glucose est ajouté au milieu initial, le taux de dégradation de 50 ppm de PCP est de 5.5 ppm PCP/h tandis que le taux spécifique de dégradation est de  $2 \times 10^{-12}$  mg PCP/cellule.h. En absence de glucose, le  $r_s$  est d'environ 2.4 ppm PCP/h entre 25 et 50 ppm de PCP. En augmentant la concentration en PCP, le taux de dégradation diminue. Un phénomène similaire est observé pour les taux spécifiques de dégradation du PCP. Un taux moyen de  $1.5 \times 10^{-11}$  mg PCP/cellule.h a été calculé entre 25 et 75 ppm de PCP puis une baisse a été enregistrée lorsque la concentration en PCP augmente. Dans les deux cas, cette baisse peut être attribuée à une dilution du milieu lors des ajouts en PCP ou à un apport

trop important après la dégradation du 50 ppm de départ.

En comparant ces divers taux avec ceux obtenus en cuvée, il semble que lorsque le milieu est inoculé directement du chemostat, les taux de dégradation en cuvée sont similaires à ceux observés en cuvée alimentée. Par contre, lorsque du glucose est ajouté au départ dans l'inoculum, le taux de dégradation,  $r$ , en cuvée alimentée est beaucoup plus élevé qu'en cuvée. Toutefois, le taux spécifique calculé en cuvée alimentée est plus faible qu'en cuvée. Dans les deux cas, une concentration finale en biomasse plus élevée en cuvée alimentée explique ces résultats.

Une comparaison globale des deux stratégies d'inoculation et des deux types de procédés indique que la dégradation du PCP est plus rapide en ajoutant du glucose initialement au milieu de culture et en opérant le système en cuvée alimentée. L'augmentation de la concentration cellulaire totale ainsi que du taux de dégradation lorsqu'opéré de cette façon explique ce résultat. De plus, la présence d'une latence lors d'un traitement en cuvée, qui augmente avec la concentration initiale en PCP et qui n'intervient pas dans le calcul des taux de dégradation, fait en sorte que ce type de procédé est moins favorisé.

## RECOMMANDATIONS

L'étude réalisée sur la dégradation du PCP dans un milieu aqueux a permis d'émettre plusieurs conclusions quant à l'importance de la stratégie d'inoculation utilisée ainsi que du type de traitement choisi, soit en cuvée ou en cuvée alimentée. Par contre, certaines recommandations s'imposent afin de préciser des points qui n'ont pu être abordés lors de la présente étude.

- Il a été déterminé qu'en cuvée, le taux spécifique de dégradation du PCP comme seule source de carbone était d'ordre zéro entre 50 et 500 ppm. D'autres essais avec des concentrations inférieures et supérieures à cette plage, permettraient de vérifier que la cinétique d'enlèvement du PCP suit bien le modèle d'inhibition de Haldane. De plus, ces résultats permettraient de calculer les constantes cinétiques s'y rattachant.

- Il serait intéressant d'émettre des indications sur la voie métabolique du PCP. Par un échantillonnage fréquent lors de la période de dégradation, l'analyse au CG/SM permettrait d'identifier et quantifier certains métabolites produits dans le temps.

- Il a été mentionné qu'une étude préliminaire a montré que le consortium A était constitué de trois colonies différentes. De ces colonies, il semble qu'une seule ait la capacité à dégrader le PCP mais qu'après quelques transferts sur pétri, cette colonie perd cette capacité. Il serait important de refaire cette expérience et déterminer qu'il y ait bien qu'une seule colonie qui puisse dégrader le PCP. De plus, le nombre de transferts possible avant que la colonie ne perde sa capacité à dégrader le PCP devrait être évalué. Ce résultat est important car si le consortium est conservé sur pétri, il se peut qu'il ne puisse plus dégrader le PCP après un certain temps.

- La dégradation du PCP an milieu aqueux a été étudiée. Il serait intéressant de vérifier, en flacon, si l'ajout de sol contaminé au milieu de culture changerait les taux de dégradation calculés en milieu aqueux. Dans la même optique, lors d'un traitement de sol contaminé, le PCP est souvent désorbé par l'ajout de surfactant ou dispersant. Une étude sur l'influence de ces produits sur l'activité microbienne du consortium est donc essentielle avant leur utilisation.

## BIBLIOGRAPHIE

AUTHENRIETH, R.L., BONNER, J.S., AKGERMAN, A., OKAYGUN, M. et MCCREARY, E.M., 1991, "Biodegradation of Phenolic Wastes", Journal of Hazardous Materials, Vol. 28, pp. 29-53.

BELLIN, C.A., O'CONNOR, G.A. et JIN, Y., 1990, "Sorption and Degradation of Pentachlorophenol in Sludge-Amended Soils", J. Environ. Qual., Vol. 19, pp. 603-608.

BOWER CARBERRY, J. et KOVACH, L.E., 1992, "Decrease in Toxicity of Pentachlorophenol and Toluene to Growth of Selected Microbial Consortia and Activated Sludge by Pretreatment with *Phanerochaete chrysosporium*", Wat. Sci. Tech., Vol. 26, No. 9-11, pp. 2125-2128.

BOYD, S.A., MIKESELL, M.D. et LEE, J.F., 1989, "Chlorophenols in Soils. Reactions and Movements of Organic Chemicals in Soils", Special Publication no. 22, by Soil Science of America and American Society of Agronomy, Madison, WI., U.S.A., pp. 209-228.

BROWN, E.J., PIGNATELLO, J.J., MARTINSON, M.M. et CRAWFORD, R.L., 1986, "Pentachlorophenol Degradation : a Pure Bacterial Culture and an Epilithic Microbial Consortium", Appl. Environ.

Microbiol., Vol. 52, No. 1, pp. 92-97.

BRYANT, F.O., HALE, D.D. et ROGERS, J.E., 1991, "Regiospecific Dechlorination of Pentachlorophenol by Dichlorophenol-Adapted Microorganisms in Freshwater, Anaerobic Sediment Slurries", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 57, No. 8, pp. 2293-2301.

BUITRON, G., KOEFOED, A. et CAPDEVILLE, B., 1992, "Microbial Activity Evolution During Acclimation of a Mixed Culture to Phenol : Use of CO<sub>2</sub> Evolution Rate as Indicator", Wat. Sci. Tech., Vol. 26, No. 9-11, pp. 2049-2052.

CHU, J.P. et KIRSCH, E.J., 1972, "Metabolism of Pentachlorophenol by an Axenic Bacterial Culture", Appl. Microbiol., Vol. 23, No. 5, pp. 1033-1035.

CRAWFORD, R.L., 1987, "Biodegradation of Pentachlorophenol", United States Patent, Pat. 4 713 340.

CRAWFORD, R.L. et MOHN, W.W., 1985, "Microbiological Removal of Pentachlorophenol from Soil Using a *Flavobacterium*", Enzyme Microb. Technol., Vol. 7, pp. 617-620.

CSERJESI, A.J. et JOHNSON, E.L., 1972, "Methylation of Pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*", Can. J.



Microbiol., Vol. 18, pp. 45-49.

EDGEHILL, R.U. et FINN, R.K., 1982, "Isolation, Characterization and Growth Kinetics of Bacteria Metabolizing Pentachlorophenol", Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 16, pp. 179-184.

EDWARDS, E.A., EDWARDS, A.M. et GRBIĆ-GALIĆ, D., 1994, "A Method for Detection of Aromatic Metabolites at Very Low Concentrations: Application to Detection of Metabolites of Anaerobic Toluene Degradation", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 60, No. 1, pp 323-327.

FEWSON, C.A., 1991, "Factors Affecting the Degradation of Hazardous Recalcitrant Materials", ISEB, pp. 173-183.

GONZALEZ, J.F. et HU, W.S., 1991, "Effect of Glutamate on the Degradation of Pentachlorophenol by *Flavobacterium* sp.", Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 35, pp. 100-104.

GUTHRIE, M.A., KIRSCH, E.J., WUKASCH, R.F. et GRADY, C.P.L., 1984, "Pentachlorophenol Biodegradation - II : Anererobic", Water Research, Vol. 18, pp. 451-461.

HÄGGBLOM, M.M., NOHYNEK, L.J. et SALKINOJA-SALONEN, M.S., 1988, "Degradation and O-Methylation of Chlorinated Phenolic Compounds by *Rhodococcus* and *Mycobacterium* Strains", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 54, No. 12, pp. 3043-3052.

HÄGGBLOM, M.M. et SALKINOJA-SALONEN, M.S., 1991, "Biodegradability of Chlorinated Organic Compounds in Pulp Bleaching Effluents", Env. Sci. Tech., Vol. 24, No. 3/4, pp. 161-170.

HAKULINEN, R. et SALKINOJA-SALONEN, M.S., 1981, "An Anaerobic Fluidised-Bed Reactor for Treatment of Industrial Wastewater Containing Chlorophenols", Proc. Conf., Manchester, Water Res. Center, pp. 374-382.

HEIPIEPER, H.J., KEWELOH, H. et REHM, H.J., 1991, "Influence of Phenols on Growth and Membrane Permeability of Free and Immobilized *Escherichia coli*", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 57, No. 4, pp. 1213-1217.

HENRYSSON, T. et McCARTY, P.L., 1993, "Influence of Endogenous Storage Lipid Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate on the Reducing Power Availability during Cometabolism of Trichloroethylene and Naphtalene by Resting Methanotrophic Mixed Cultures", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 59, No. 5, pp. 1602-1606.

HILL, G.A., TOMUSIAK, M.E., QUAIL, B. et VAN CLEAVE, K.M., 1991, "Bioreactor Design Effects on Biodegradation Capabilities of VOCs in Wastewater", Environmental Progress, Vol. 10, No. 2, pp. 147-153.

KAUFMAN, D.D, 1978, " Degradation of Pentachlorophenol in Soil, and by Soil Microorganisms. Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology, and Environmental Toxicology", édité par Rao K.R., Plenum Press, New York, pp. 27-39.

KIM, C.J. et MAIER, W.J., 1986, "Biodegradation of Pentachlorophenol in Soil Environments", Proceedings 41st Purdue University Industrial Waste Conference, pp. 303-312.

KLECKA, G.M. et MAIER, W.J., 1984, "Kinetics of Microbial Growth on Pentachlorophenol", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 49, No. 1, pp. 46-53.

LARSEN, S., HENDRIKSEN, H.V. et AHRING, B.K., 1991, "Potential for Thermophilic (50 C) Anaerobic Dechlorination of Pentachlorophenol in Dofferent Ecosystems", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 57, No. 7, pp. 2085-2090.

LIN, J-E, WANG, H.Y. et HICKEY, R.F., 1990, "Degradation Kinetics of Pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*",

Biotechnology and Bioengineering, Vol. 35, pp. 1125-1134.

LIN J-E et WANG, H.Y., 1991, "Degradation of Pentachlorophenol by Non-Immobilized, Immobilized and Co-Immobilized *Arthrobacter* Cells", Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 72, No. 4, pp. 311-314.

MADDEN, M. et TITTLEBAUM, M., 1983, "Biological Treatability of Pentachlorophenol Wastewater", J. Environ. Sci. Health, Vol. 18, No. 4, pp. 583-596.

MADSEN, T. et AAMAND, J., 1992, "Anaerobic Transformation and Toxicity of Trichlorophenols in a Stable Enrichment Culture", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 58, No. 2, pp. 537-561.

MELCER, H. et BEDFORD, W.K., 1988, "Removal of Pentachlorophenol in Municipal Activated Sludge Systems", J. Water Pollut. Control Fed., Vol. 60, No. 5, pp. 622-626.

MENN, F.M., APPLGATE, B.M. et SAYLER, G.S., 1993, "NAH Plasmid-Mediated Catabolism of Anthracene and Phenanthrene to Naphthoic Acids", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 59, No. 6, pp. 1938-1942.

MENVIQ, 1990, "Guide des méthodes de conservation et d'analyses des échantillons d'eau et de sol", Direction des laboratoires, Ministère de l'Environnement du Québec, Québec.

MIKESELL, M.D. et BOYD, S.A., 1986, "Complete Reductive Dechlorination and Mineralization of Pentachlorophenol by Anaerobic Microorganisms", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 52, No. 4, pp. 861-865.

MIKESELL, M.D. et BOYD, S.A., 1988, "Enhancement of Pentachlorophenol Degradation in Soil through Induced Anaerobiosis and Bioaugmentation with Anaerobic Sewagw Sludge", Environ. Sci. Technol., Vol. 22, No. 12, pp. 1411-1414.

MOOS, L.P., KIRSCH, E.J., WUKASCH, R.F. et GRADY Jr, C.P.L., 1983, "Pentachlorophenol Biodegradation-I", Water Res., Vol. 17, No. 11, pp. 1575-1584.

O'REILLY, K. et CRAWFORD, R.L., 1989, "Degradation of Pentachlorophenol by Polyurethane-Immobilized *Flavobacterium* Cells", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 55, No. 9, pp. 2113-2118.

RADEHAUS, P.M. et SCHMIDT, S.K., 1992, "Characterization of a Novel *Pseudomonas* sp. That Mineralizes High Concentrations of

Pentachlorophenol", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 58, No. 9, pp. 2879-2885.

RAMSAY, B.A., ZNOJ, G.M. et COOPER, D.G., 1986, "Use of a Nylon Manufacturing Waste as an Industrial Fermentation Substrate", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 52, No. 1, pp. 152-156.

ROTT, B., NITZ, S. et KORTE, F., 1979, "Microbial Decomposition of Sodium Pentachlorophenol", J. Agric. Food Chem. Vol. 27, No. 2, pp. 306-310.

RUCKDESCHEL, G., RENNER, G. et SCHWARZ, K., 1987, "Effects of Pentachlorophenol and Some of Its Known and Possible Metabolites on Different Species of Bacteria", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 53, No. 11, pp. 2689-2692.

RUTGERS, M., BOGTE, J., BREURE, A. et VAN ANDEL, J., 1991, "Biodegradation of Pentachlorophenol by Aerobic Enrichment Cultures", International Symposium on Environmental Biotechnology, Ostend, Belgique, pp. 99-102.

SABER, D.L. et CRAWFORD, R.L., 1985, "Isolation and Characterization of *Flavobacterium* sp. That Degrade Pentachlorophenol", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 50, No.

12, pp. 1512-1518.

SANSEVERINO, J., APPLGATE, B.M., HENRY KING, J.M. et SAYLER, G.S., 1993, "Plasmid-Mediated Mineralization of Naphthalene, Phenanthrene, and Anthracene", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 59, No. 6, pp. 1931-1937.

SEECH, A.G., TREVORS, J.T. et BULMAN, T.L., 1991, "Biodegradation of Pentachlorophenol in Soil: the Response to Physical, Chemical, and Biological Treatments", Can. J. Microbiol., Vol. 37, pp. 440-444.

SHARABI, N.E.D. et BARTHA, R., 1993, "Testing of Some Assumptions about Biodegradation in Soil as Measured by Carbon Dioxide Evolution", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 59, No. 4, pp. 1201-1205.

SMITH, P.D., BROCKWAY, D.L. et STANCIL, F.E., 1987, "Effects of Hardness, Alkalinity and pH on the Toxicity of Pentachlorophenol to *Selenastrum capricornutum* (Printz)", Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 6, pp. 891-900.

STANLAKE, G.J. et FINN, R.K., 1982, "Isolation and Characterization of a Pentachlorophenol-Degrading Bacterium", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 44, No. 6, pp. 1421-1427.

STEIERT, J.G., PIGNATELLO, J.J. et CRAWFORD, R.L., 1987, "Degradation of Chlorinated Phenols by a Pentachlorophenol-Degrading Bacterium", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 53, No. 5, pp. 907-910.

STUCKI, G. et ALEXANDER, M., 1987, "Role of Dissolution Rate and Solubility in Biodegradation of Aromatic Compounds", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 53, No. 2, pp. 292-297.

TOPP, E., CRAWFORD, R.L. et HANSON R., 1988, "Influence of Readily Metabolizable Carbon on Pentachlorophenol Metabolism by a Pentachlorophenol-Degrading *Flavobacterium* sp.", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 54, No. 10, pp. 2452-2459.

TOOP, E. et HANSON, R.S., 1990, "Degradation of Pentachlorophenol by a *Flavobacterium* Species Grown in Continuous Culture under Various Nutrient Limitations", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 56, No. 2, pp. 541-544.

WATANABE, I., 1973, "Isolation of Pentachlorophenol Decomposing Bacteria from Soil", Soil Sci. Plant Nutr., Vol.19, pp. 109-116.



WATANABE, I., 1977, "Pentachlorophenol-Decomposing and PCP-Tolerant Bacteria in Field Soil Treated With PCP", Soil Biol. Biochem., Vol. 9, pp. 99-103.

**ANNEXE 1 : SÉQUENCES D'ADAPTATION DES SOUCHES PURES**

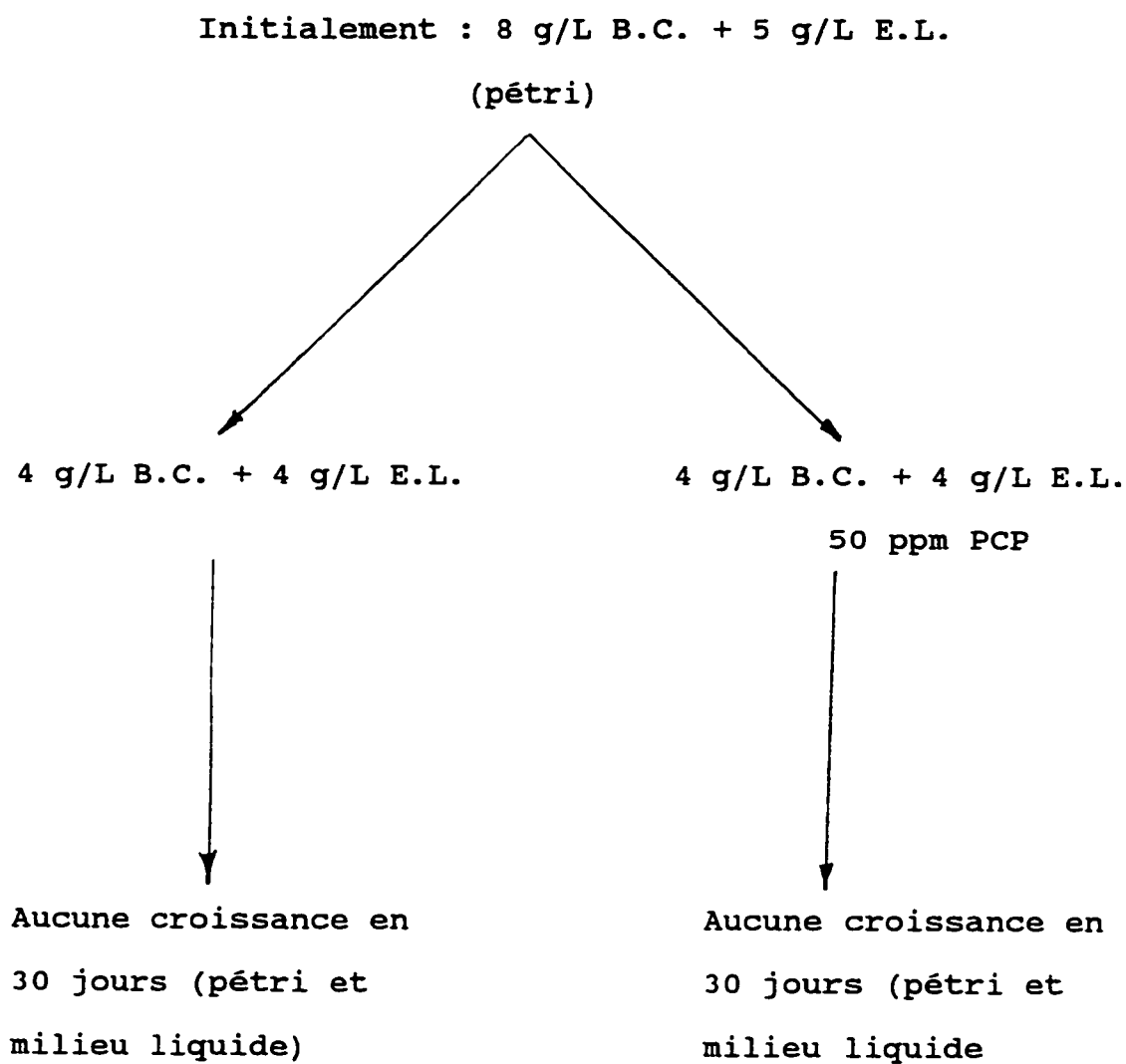


Figure A.1.1 : Séquences d'adaptation d'*Arthrobacter*

Milieu de croissance	Observations	
	Pétri	Liquide
4 g/L E.L. + 4 g/L Glc (gélose inclinée)		
↓		
4 g/L E.L. + 4 g/L Glc + 50 ppm PCP	3 jours croissance	5 jours croissance
↓		
2 g/L E.L. + 2 g/L Glc + 50 ppm PCP	20 jours pas croissance	-----
↓		
4 g/L E.L. + 4 g/L Glc + 50 ppm PCP	14 jours pas croissance	-----
↓		
2 g/L E.L. + 2 g/L Glc + 50 ppm PCP	14 jours pas croissance	-----
↓		
1 g/L E.L. + 1 g/L Glc + 50 ppm PCP	14 jours pas croissance	-----

## PERTE DE LA SOUCHE

Figure A.1.2 : Séquences d'adaptation de *Flavobacterium*

Milieu de croissance	Observations
4 g/L E.L. + 4 g/L Glc (gélose inclinée)	
↓	
4 g/L E.L. + 4 g/L Glc	PCP-I, CP-2, CG-I : Faible croissance
↓	
4 g/L E.L. + 4 g/L Glc	PCP-I: pas croissance CP-2, CG-I : 8 jours croissance
↓	
4 g/L E.L. + 4 g/L Glc + 50 ppm PCP	CP-2 : 20 jours pas de croissance CG-I : 6 jours, très faible croissance
↓	
4 g/L E.L. + 4 g/L Glc + 10 ppm PCP	CP-2 : 11 jours, pas de croissance CG-I : 11 jours, faible croissance

Figure A.1.3 : Séquences d'adaptation de *Rhodococcus* PCP-I, CP-2 et CG-I sur pétri.

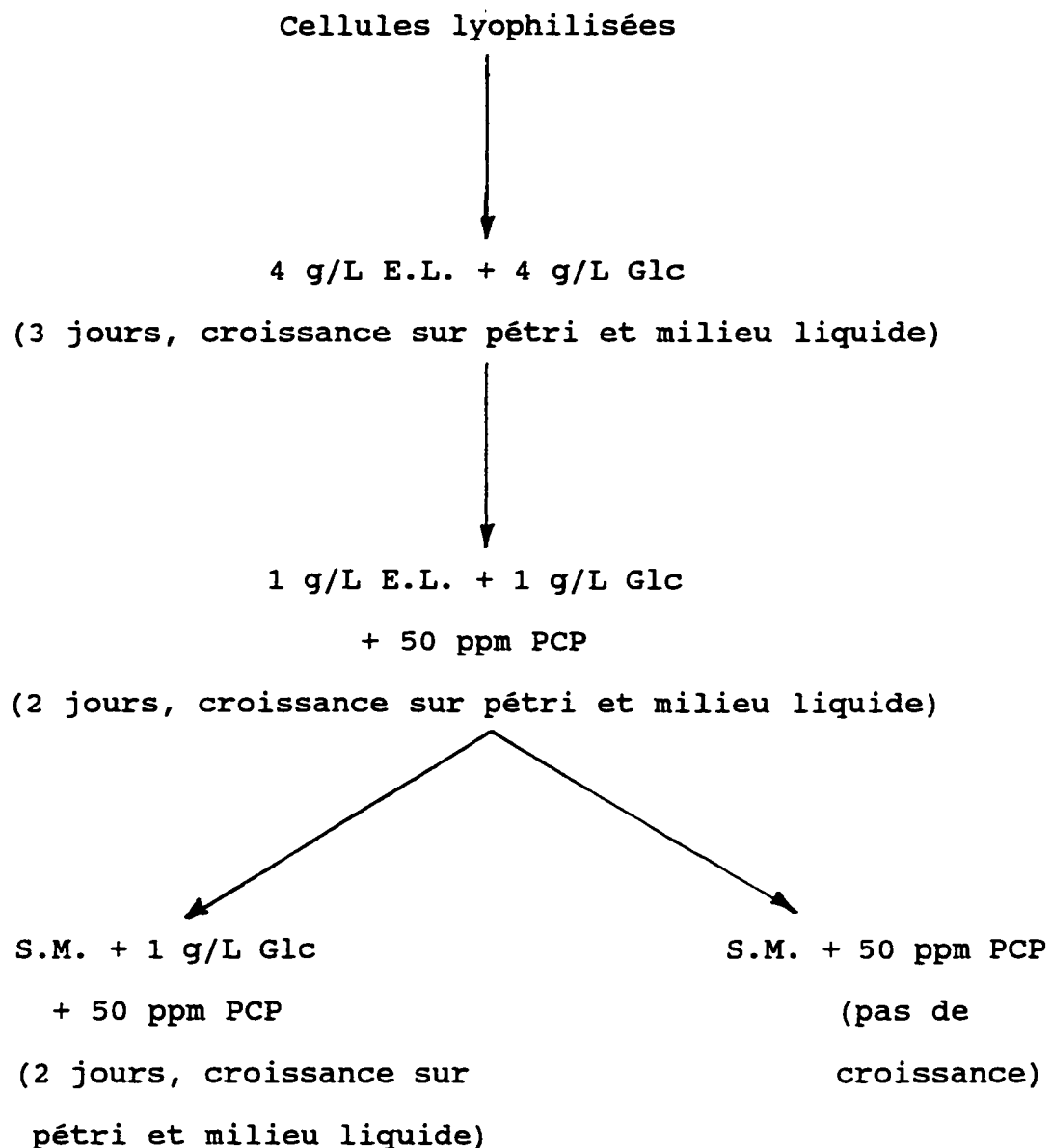


Figure A.1.4.1 : Séquences d'adaptation de *Pseudomonas cepacia* à partir de cellules lyophilisées

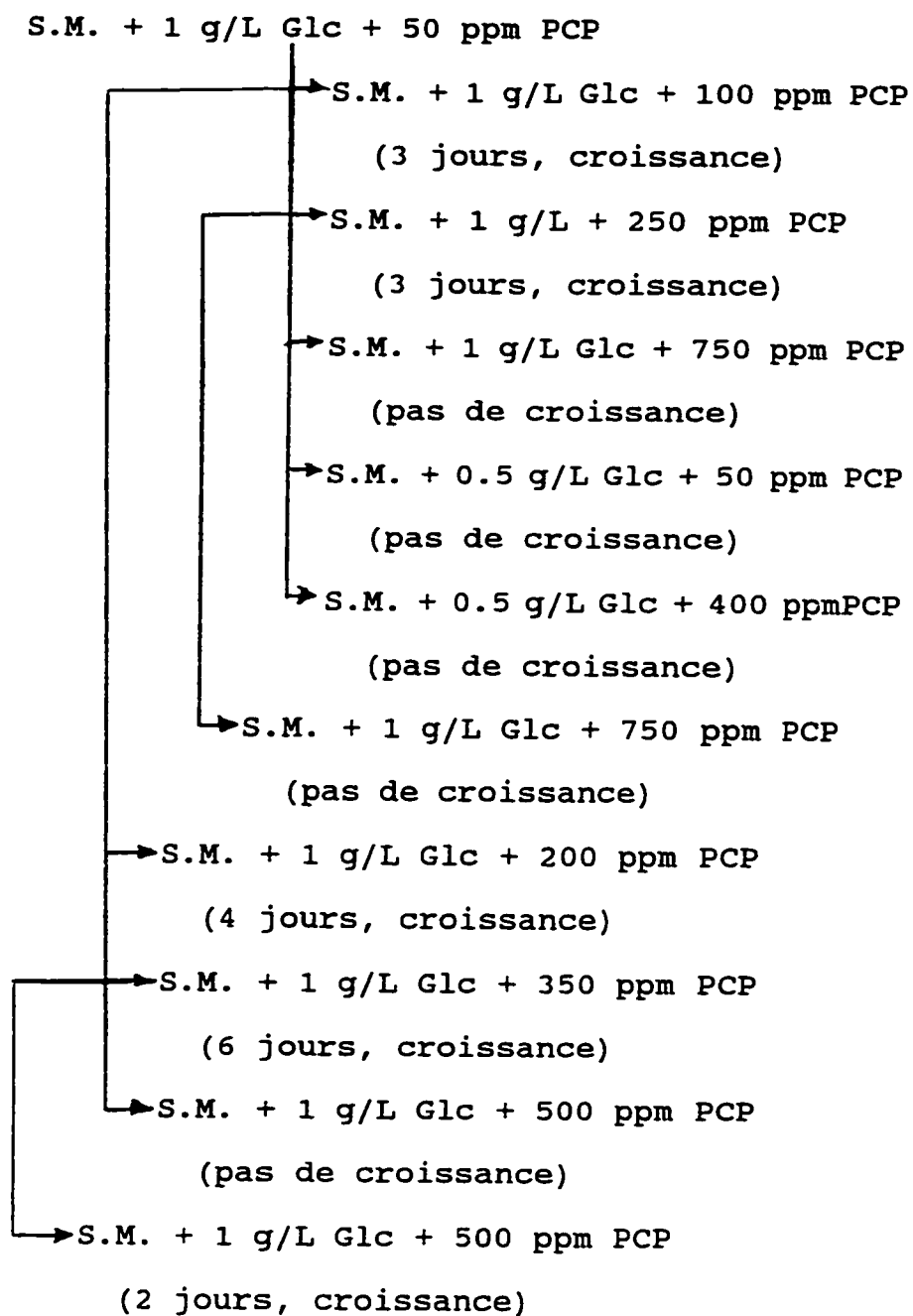


Figure A.1.4.2 : Séquences d'adaptation de *Pseudomonas cepacia* à différentes concentrations en PCP

**ANNEXE 2 : ÉTUDE DE DÉGRADATION DU PCP AVEC  
DIFFÉRENTS CO-SUBSTRATS**



## ANNEXE 2 : ÉTUDE AVEC DIFFÉRENTS CO-SUBSTRATS

Tableau A.2 : Dégradation du PCP en présence de différents co-substrats

Temps (heure)	Témoin <sup>1</sup> (ppm)	Glucose <sup>2</sup> (ppm)	Acide glutami- que (ppm)	Acétate sodium (ppm)	Acide succini- que (ppm)
72 <sup>3</sup>	52	41	41	42	41
96	49	40	44	46	44
120	13	30	41	45	44
144	14	15	36	43	42
168	--	--	20	22	40
240	--	--	--	--	0

1. Témoin contient que du PCP comme seule source de carbone
2.  $5.6 \times 10^{-3}$  moles de C/L de chaque co-substrat ont été ajoutés à chaque fiole.
3. À t=0 h, PCP entre 50 et 40 ppm.

**ANNEXE 3 : ÉVOLUTION DE LA BIOMASSE TOTALE ET DÉGRADATION  
DU GLUCOSE ET DU PCP POUR LES INOCULUMS 1 ET 2**

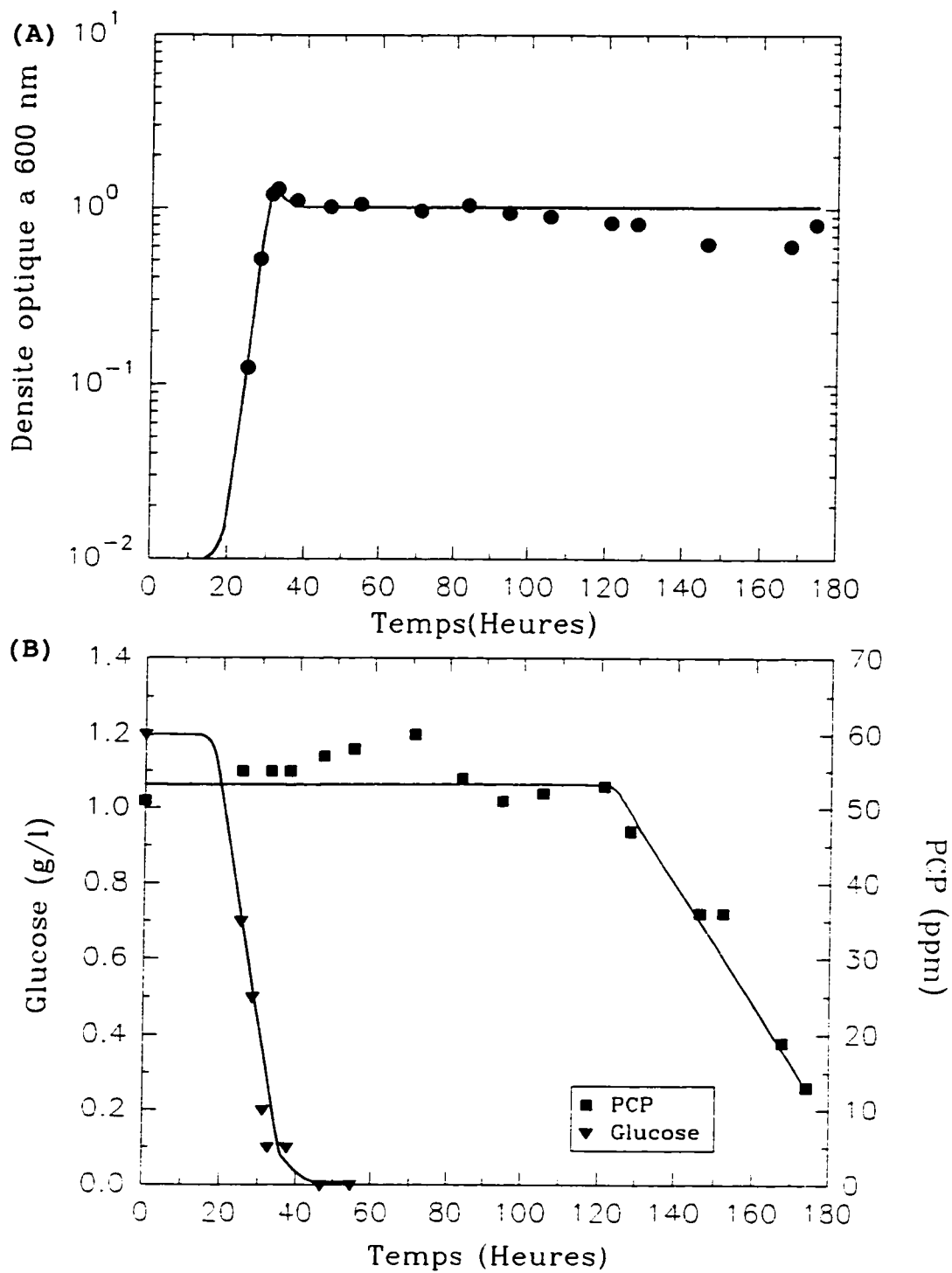


Figure A.3.1 : Évolution de la biomasse totale (A) et dégradation du glucose et du PCP (B) pour l'inoculum 1

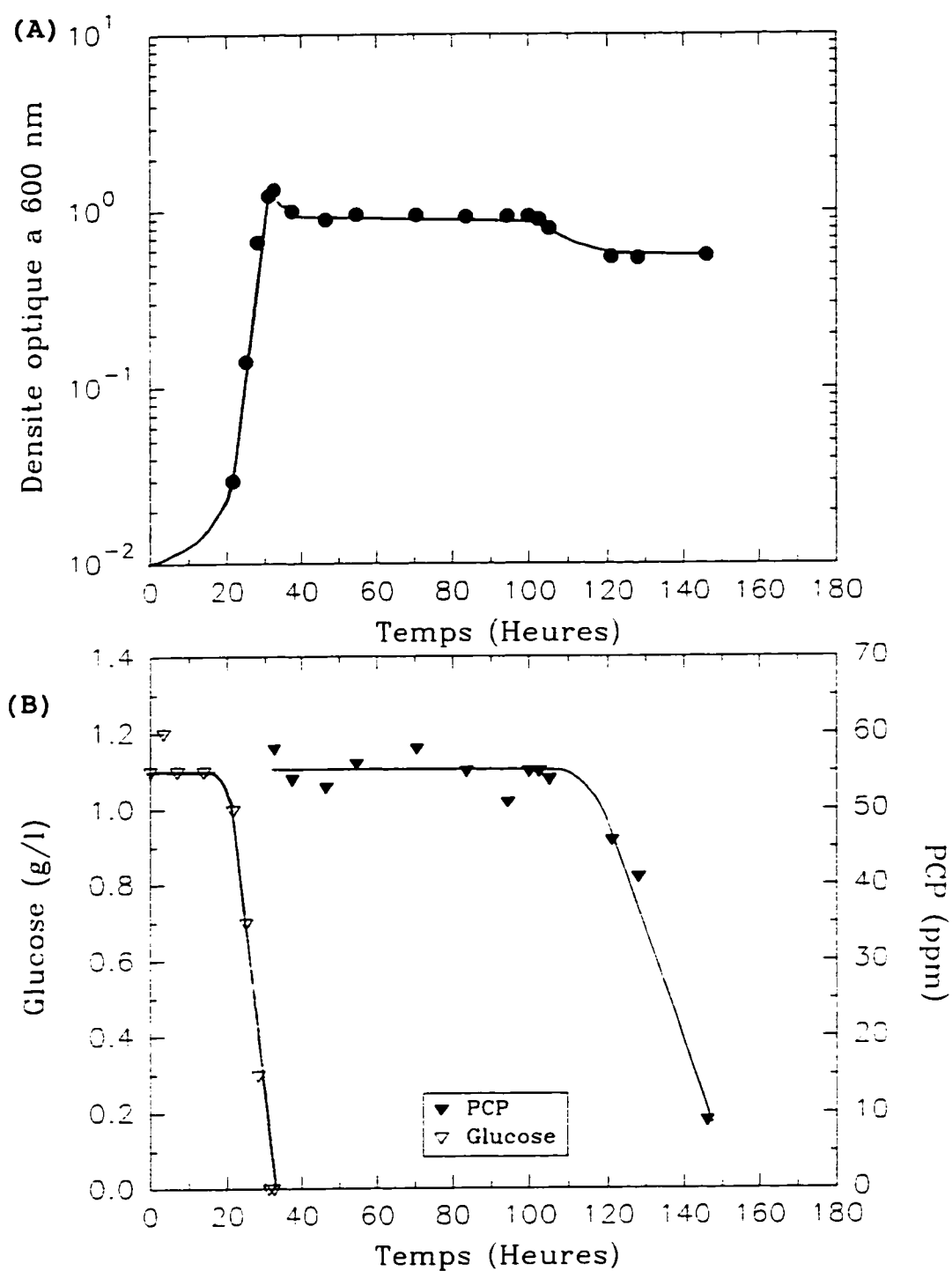


Figure A.3.2 : Évolution de la biomasse totale (A) et dégradation du glucose et du PCP pour l'inoculum 2

**ANNEXE 4 : DÉGRADATION DU PCP PAR DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS  
INITIALES EN BIOMASSE**

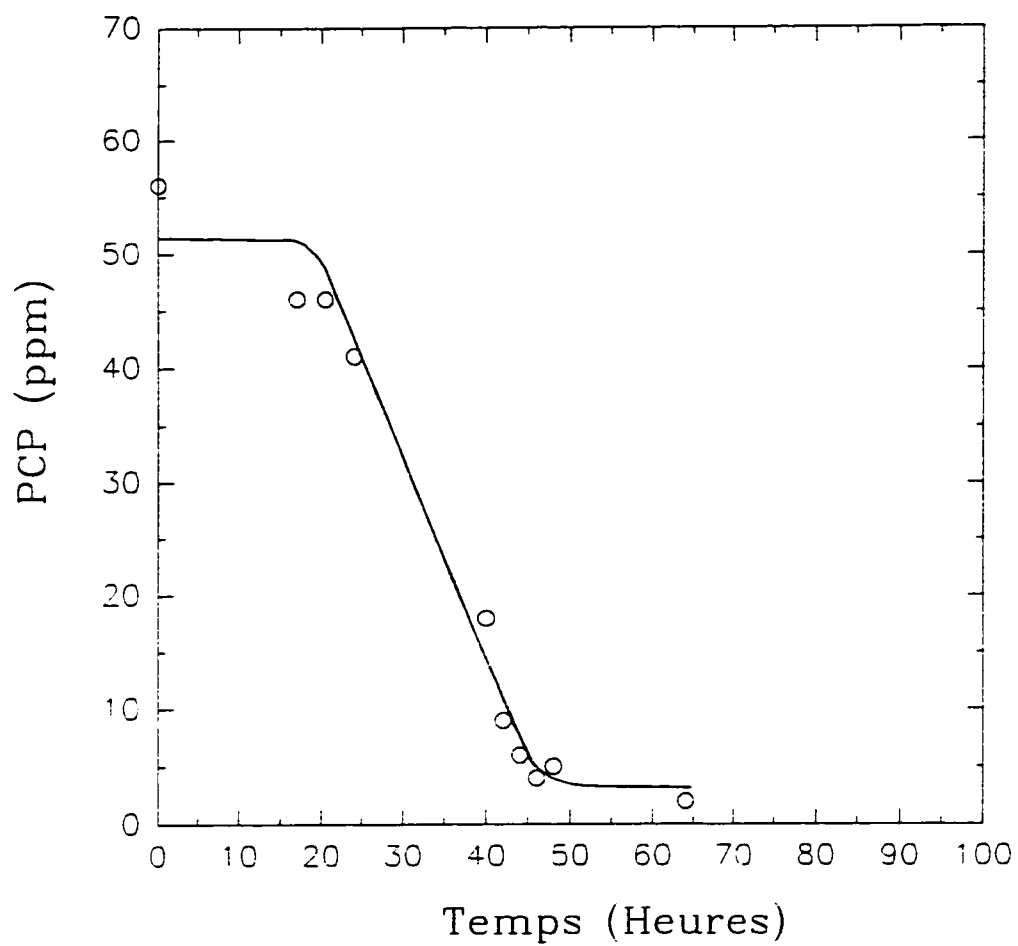


Figure A.4.1 : Dégradation du PCP par une concentration initiale en biomasse de  $3.5 \times 10^9$  cellules/mL (inoculum préparé avec glucose)

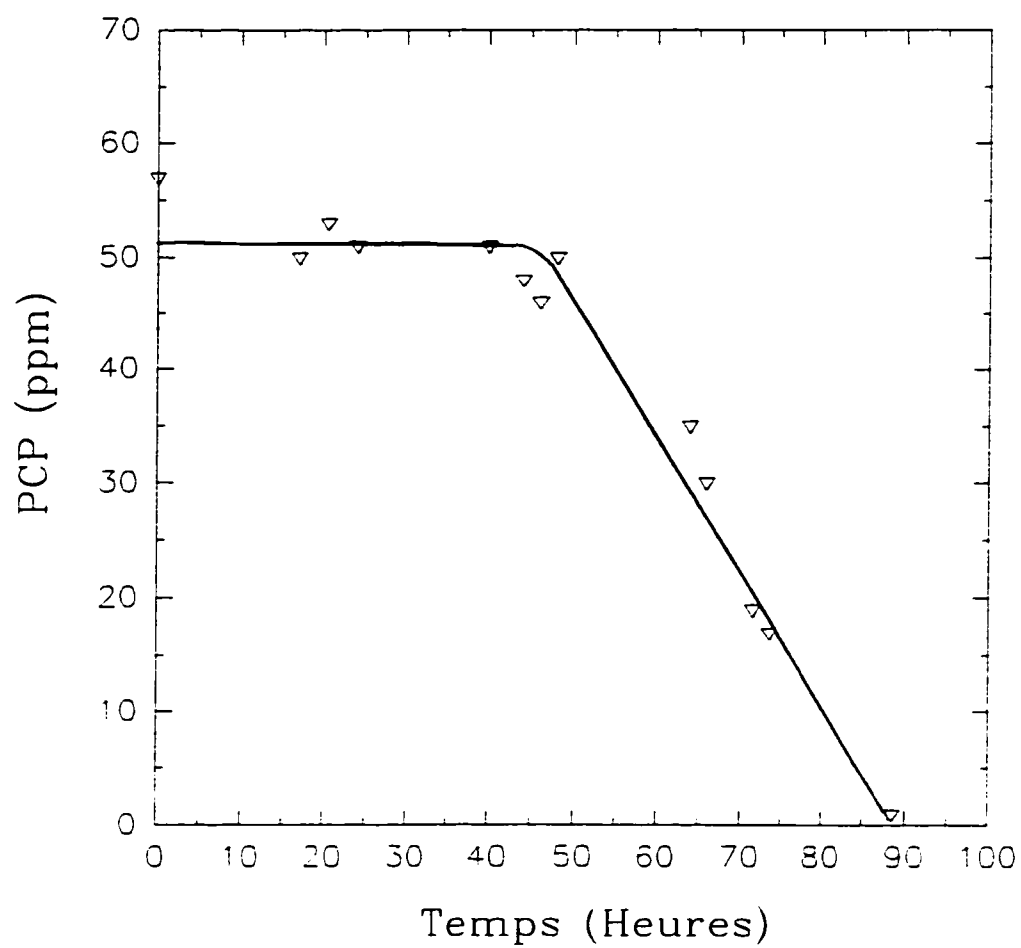


Figure A.4.2 : Dégradation du PCP par une concentration initiale en biomasse de  $7 \times 10^8$  cellules/mL (inoculum préparé avec glucose)

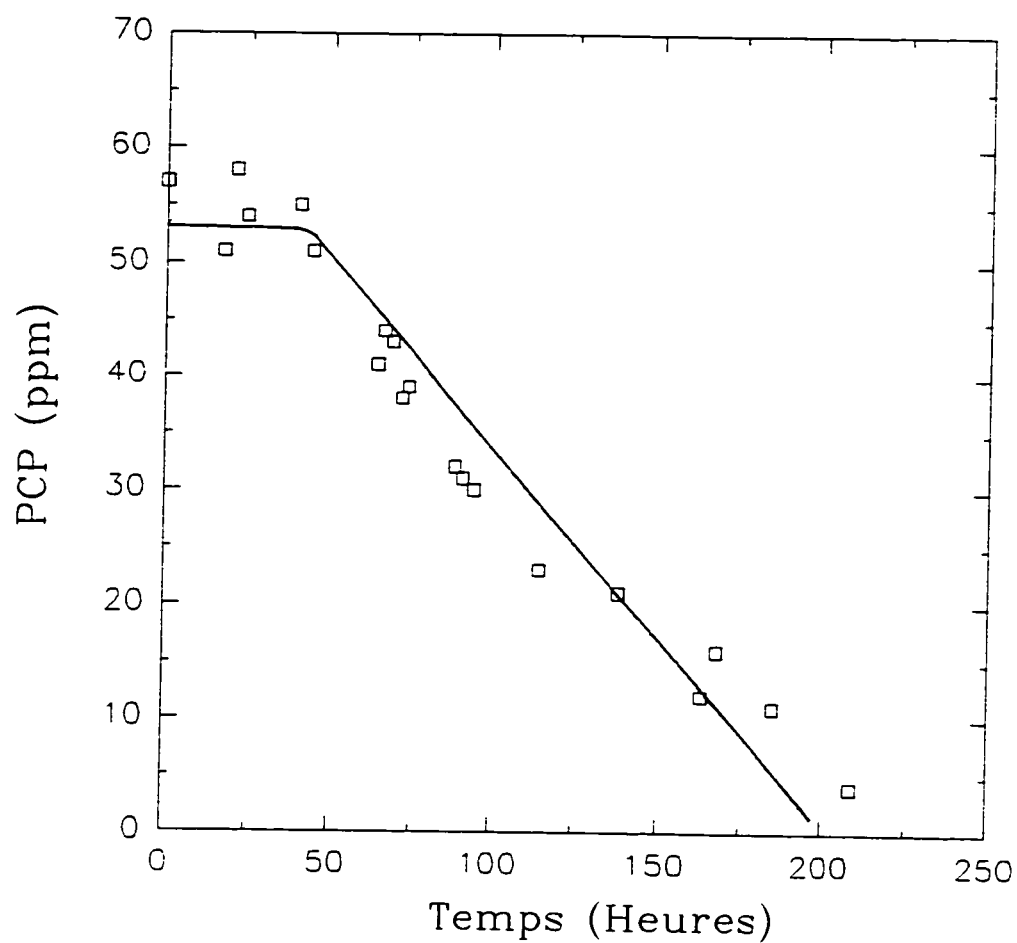


Figure A.4.3 : Dégradation du PCP apr une concentration initiale en biomasse de  $1.4 \times 10^8$  cellules/mL (inoculum préparé avec glucose)



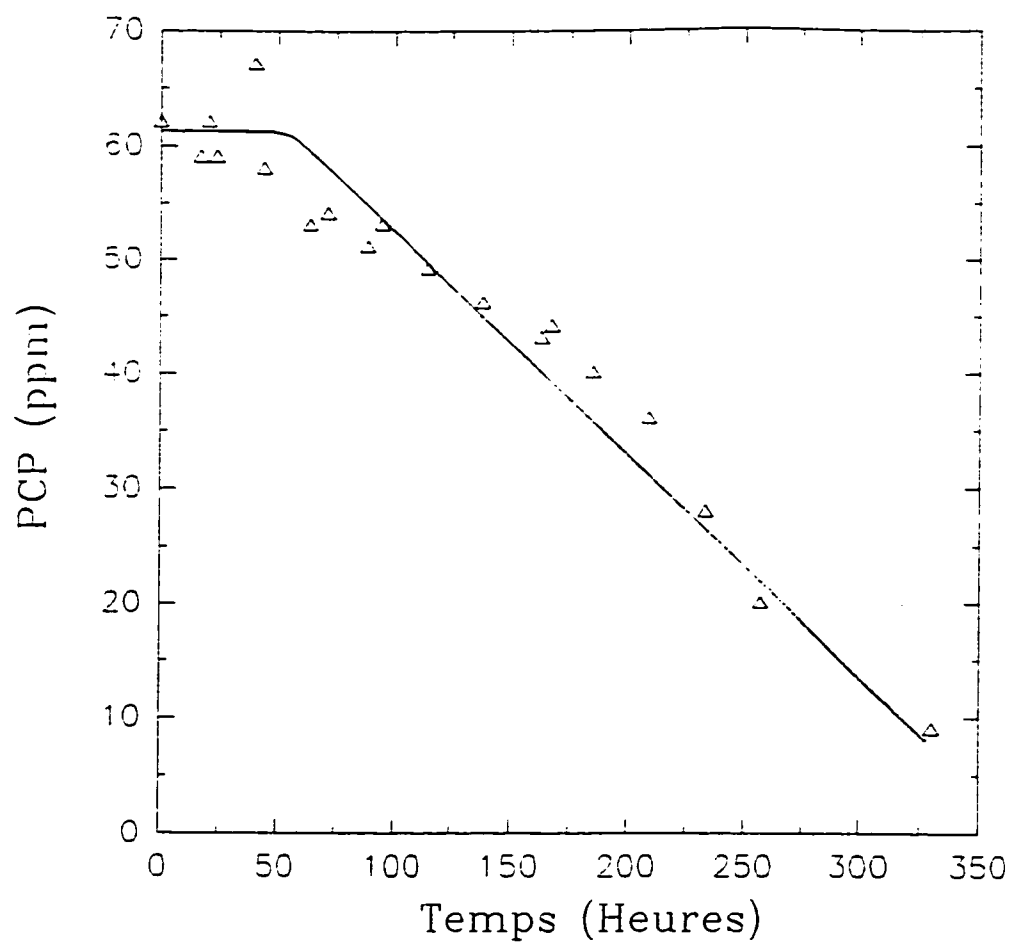
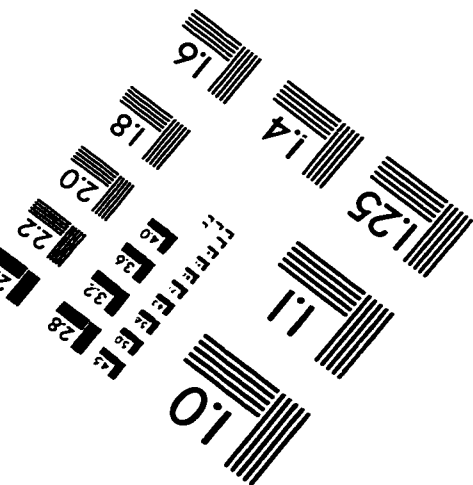
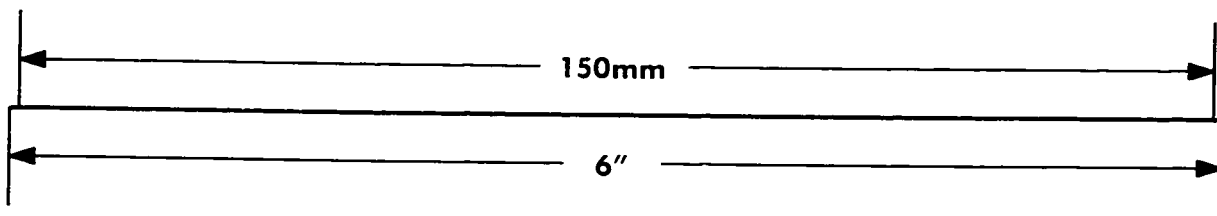
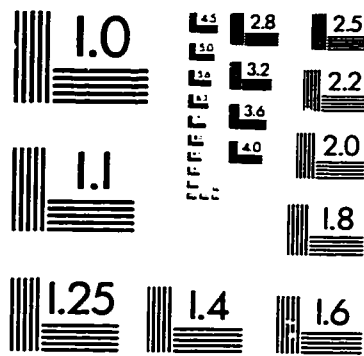
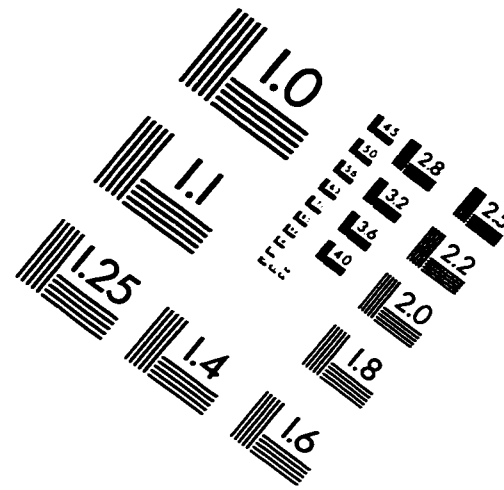
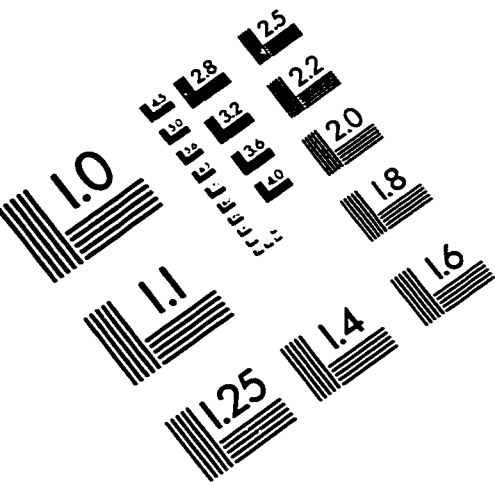


Figure A.4.4 : Dégradation du PCP par une concentration initiale en biomasse de  $3.5 \times 10^7$  cellules/mL (inoculum préparé avec glucose)

# IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc.  
1653 East Main Street  
Rochester, NY 14609 USA  
Phone: 716/482-0300  
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved

